

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta
Katedra biochemie



Kateřina Bittenglová

Dědičné poruchy glykosylace: metody analýzy glykanů
Congenital disorders of glycosylation: methods of glycans analysis

Bakalářská práce

Vedoucí práce: RNDr. Hana Hansíková, CSc.
Konzultant: prof. RNDr. Petr Hodek, CSc.

bakalářský studijní program Biochemie

Pracoviště: Laboratoř pro studium mitochondriálních poruch,
KDDL 1. LF UK a VFN

Praha, 2017

„Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Hany Hansíkové, CSc. a prof. RNDr. Petra Hodka, CSc. všechny použité prameny jsem řádně citovala.“

Místo a datum:

Podpis:

Poděkování

V první řadě bych chtěla poděkovat mé školitelce RNDr. Haně Hansíkové, CSc. za velmi precizní vedení během tvorby této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat kolektivu laboratoře za přátelské přijetí. Jmenovitě bych ráda poděkovala Mgr. Janě Křížové a Mgr. Haně Beránkové za pomoc a trpělivost s experimentální částí a za jejich velmi cenné rady. Mé poděkování patří i prof. RNDr. Petru Hodkovi, CSc. za poskytnutí praktických připomínek.

Práce vznikla za podpory grantového projektu: AZV MZ ČR 16-31932A a PROGRES Q26.

Abstrakt

Dědičné poruchy glykosylace (CDG) představují skupinu více než 100 typů metabolických onemocnění, jejich příčinou jsou poruchy v syntéze a úpravě glykokonjugátů. Důsledkem je rozsáhlé spektrum klinických projevů, od poruch nervové soustavy po obtíže soustavy trávicí a vylučovací. Rozpoznat, o který konkrétní typ CDG se jedná, by nebylo možné bez celého spektra biochemických a molekulárně-genetických metod. Cílem této bakalářské práce bylo v teoretické části představit nejčastěji využívané metody k analýze oligosacharidového řetězce, který je součástí glykosylovaných proteinů nebo lipidů. Základem jsou tzv. „screeningové“ metody, jako je např. isoelektrická fokusace vybraných glykoproteinů krevního séra transferinu a apolipoproteinu CIII. V rámci různých nadstavbových metod se provádí další analýzy, jako měření enzymové aktivity, hmotnostní spektroskopie, analýza PDO (oligosacharidy vázané na protein) a LLO (oligosacharidy vázané na lipid) a HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) a CZE (kapilární zónová elektroforéza). Při určení finální diagnózy je vždy prováděna i molekulární diagnostika, která potvrzuje přítomnost mutací v konkrétním genu. Cílem praktické části bakalářské práce bylo provést v rámci pilotního experimentu analýzu exprese genů pro OGA (N-acetylglukosaminasy) a OGT (N-acetylglukosaminyltransferasy), které se účastní syntézy resp. hydrolysy vazby N-acetylglukosaminu (O-GlcNac) a polypeptidického řetězce. Nerovnováha těchto dvou reakcí může být odrazem různých patologických stavů. Biologickým materiálem byly izolované lymfocyty z periferní krve. Izolace RNA byla provedena pomocí TriReagentu a analýza genů byla studována pomocí qPCR (kvantitativní polymerasová řetězová reakce). Uvedené postupy budou využity ke studiu míry glykosylace pomocí O-GlcNac, např. u pacientů s diabetes mellitus 2. typu

Klíčová slova: Dědičné poruchy glykosylace, isoelektrická fokusace, qPCR

Abstract

Congenital disorders of glycosylation represent (CDG) a group with more than 100 types of metabolic disorders, which are caused by defects in biosynthesis and modification of glycoconjugates. CDG manifest by broad spectrum of clinical symptoms, from disorders of nervous system to disorders of digestion and excretion. Identification of the specific type of CDG is not possible without broad spectrum of biochemical and molecular-genetic methods. The goal of this bachelor thesis was to describe the most often used methods for analysis of glycans, which are components of glycoproteins or glycolipids, in the theoretic part. Isoelectric focusing of selected blood serum glycoproteins, (e.g. transferrin and apolipoprotein C-III) serve as screening methods. Measurement of enzymatic activity, mass spectroscopy, PDO and LLO analysis (protein derived oligosaccharide, lipid-links oligosaccharide) HPLC and CZE (capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography) are performed in second level. Molecular-genetic methods are used to confirm the final diagnosis by identification of causal mutations in specific gene. The aim of practical part of this bachelor thesis was to analyse the expression of genes OGA (N-acetylglucosaminase) and OGT (N-acetylglucosaminyltransferase). These enzymes take part in the synthesis and hydrolysis of bound N-acetylglucosamine (O-GlcNac) and polypeptidic chain. Disbalance of these two reactions could reflect to various pathological state. Pilot study RNA was isolated by TriReagent from isolated lymphocytes of peripheral blood and gene expression analysis was realised by qPCR (quantitative polymerase chain reaction). This pilot study will be used for study of glycosylation level (O-GlcNac), e.g. in patient who suffer from diabetes mellitus type 2.

Key words: Congenital disorders of glycosylation, isoelectric fokusation, qPCR

Obsah

1. Literární úvod.....	11
1.1 Struktura a funkce glykanů	11
1.2 Typy glykosylací.....	12
1.2.1 N-glykosylace	13
1.2.2 O-glykosylace	14
1.2.3 Další typy glykosylace.....	15
1.3 Dědičné poruchy glykosylace	16
1.3.3 Klinické projevy CDG	19
1.3.4 PMM2-CDG	19
1.3.5 MPI-CDG.....	20
1.4 Diagnostika různých forem glykosylace	21
1.4.1 Základní metody.....	21
1.4.1.1 Sekundární příčiny hypoglykosylace	23
1.4.1.2 Prenatální diagnostika.....	24
1.4.1.3 Isoelektrická fokusace	24
1.4.1.3.1 Isoelektrická fokusace transferinu	24
1.4.1.3.2 Isoelektrická fokusace apolipoproteinu C-III.....	27
1.4.1.4 Měření aktivity enzymů	28
1.4.1.5 Molekulární diagnostika.....	29
1.4.1.5.1 qPCR	29
1.4.2 Výzkumné metody	31
1.4.2.1 Hmotnostní spektroskopie.....	31
1.4.2.1.1 ESI-MS	32
1.4.2.1.2 MALDI-MS	34
1.4.2.6 Další možnosti analýzy	35
1.4.2.7 HPLC a CZE.....	36
1.4.2.8 Regulace pomocí glykosylace.....	37
3. Experimentální část.....	40
3.1 Materiál.....	40
3.1.1 Přístroje	40
3.1.2 Chemikálie.....	40
3.1.3 Biologický materiál	42

3.2 Metody	42
3.2.1 Izolace lymfocytů	42
3.2.2 Izolace RNA z lymfocytů	43
3.2.3 Měření koncentrace RNA	43
3.2.4 Izolace proteinové frakce z lymfocytů	43
3.2.5 Měření koncentrace proteinu dle Bradfordové	44
3.2.6 Ošetření DNAsou.....	45
3.2.7 Reverzní transkripce.....	45
3.2.8 qPCR	47
4. Výsledky	48
5. Diskuse	49
6. Souhrn	52
7. Literární zdroje	53

Zkratky

ApoC-III	apolipoprotein C-III
Asn	asparagin
BSA	hovězí sérový albumin, z angl. „bovine serum albumin“
CDG	dědičné poruchy glykosylace, z angl. „congenital disorders of glycosylation“
cDNA	komplementární deoxyribonukleová kyselina
CZE	kapilární zónová elektroforéza, z angl. „capillary zone electrophoresis“
DMII	diabetes mellitus 2. typu
dNTP	deoxynukleotidtrifosfát
Dol-P	dolicholfosfát
Dol-P-P	dolicholpyrofosfát
DTT	dithiothreitol
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ER	endoplazmatické retikulum
ESI	elektrosprejová ionizace, z angl. „electrospray ionization“
FSB	pufr pro reverzní transkripci, z angl. „frozen storage buffer“
GalNAc	N-acetylgalaktosamin
<i>GAPDH</i>	glyceraldehyd-3-P-dehydrogenasa
GDP	guanindifosfát
Glc	glukosa
GlcNAc	N-acetylglukosamin
GPI	glykosylfosfatidylinositolová kotva

HPLC	vysokotlaká kapalinová chromatografie, z angl. „high performance liquid chromatography“
HPRT	hypoxantin-guanin fosforibosyltransferasa
IEF	isoelektrická fokusace
LC	kapalinová chromatografie, z angl. „liquid chromatography“
LLO	oligosacharidy vázané na lipid, z angl. „lipid linked oligosaccharide“
MGEA5	Gen pro OGA
MALDI	matricí asistovaná laserová desorpce, z angl. „matrix-assisted laser desorption/ionization“
Man	mannosa
MPI	mannosafosfátisomerasa
MS	hmotnostní spektroskopie, z angl. „mass spektroskopie“
NADP⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, oxidovaná forma
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát, redukováná forma
OGA	N-acetylglukosaminasa
O-GlcNac	O-glykosylace přes N-acetylglukosamin
OGT	N-acetylglukosaminyltransferasa
P	anorganický fosfát
PDO	oligosacharidy vázané na protein, z angl. „protein derived oligosaccharide“
pH	záporný dekadický logaritmus aktivity oxoniových kationtů
pI	isoelektrický bod
PBS	fosfátový pufr, z anl. „phosphate buffered saline“
PMM2	fosfomannomutasa 2

PNGAsa F	N-glykosidasa F
qPCR	polymerasová řetězová reakce, z angl. „quantitative polymerase chain reaction“
RNA	ribonukleová kyselina
S	sulfát
SDS	dodecylsulfát sodný
SELDI	z angl. „surface enhanced laser desorption/ionization“
Ser	serin
Sia	kyselina sialová, kyselina N-acetylneuraminová
TBP	TATA vazebný protein, z angl. „TATA binding protein“
TF	transferin
Thr	threonin
TOF	detektor času letu, z angl. „time of flight detector“

1. Literární úvod

1.1 Struktura a funkce glykanů

Glykosylace je jednou z mnoha možných posttranslačních modifikací proteinů v savčích buňkách. Jedná se o kovalentní propojení polypeptidického řetězce přes amidickou resp. hydroxylovou skupinu aminokyselin s oligosacharidem pomocí různých jednoduchých sacharidových jednotek. Sacharidová část glykokonjugátů bývá označována jako glykan. Glykosylace probíhá postupně v mnoha enzymatických krocích ve dvou buněčných organelách, kterými jsou endoplazmatické retikulum a Golgiho aparát. Kromě proteinů mohou být glykosylované i lipidy v podobě glykosfingolipidů a glykosylfosfatidylinositolové kotvy, která je zapuštěná v lipidové dvojvrstvě membrány a vytváří struktury s polypeptidickými řetězci, které zároveň upevňuje k membráně [1]. Glykokonjugáty se v přírodě i lidském těle vyskytují v hojném množství, proteiny tvořící se na cytosolárních ribosomech glykosylaci nepodléhají, obvykle touto posttranslační modifikací prochází proteiny pocházející z ribosomu drsného endoplazmatického retikula [2]. Přibližně polovina savčích proteinů podléhá glykosylaci [3]. Až na albumin všechny proteiny procházející sítí endoplazmatické retikulum – Golgiho aparát podléhají N-glykosylaci [4].

Glykosylace má pro lidský organismus zásadní význam, glykokonjugáty plní celou řadu důležitých funkcí. Můžeme je rozdělit do několika skupin: ochrannou funkci reprezentují muciny, které jsou produkovány epiteliálními buňkami ve formě mukozního sekretu na povrchu sliznice [5], strukturní funkci mají proteoglykany a kolagenová vlákna, jež propůjčují pojivovým tkáním pevnost a elasticitu [6], imunologickou funkci vlastní krevní antigeny, které se nachází na povrchu erytrocytů, podle krevní skupiny rozlišujeme antigen A, B, které se liší rozdílnou sacharidovou jednotkou [7]. Z biologického hlediska glykany hrají důležitou roli v mezibuněčných interakcích i v interakcích buňky s extracelulárním matrix. V lidském těle glykoproteiny dále tvoří početnou skupinu proteinů krevní plazmy, membránových proteinů, jsou součástí iontových kanálů a receptorů na povrchu buňky, na které se specificky vážou lektiny, protilátky i různé toxické či patologické struktury. Tyto proteiny fungují na principu molekul schopných rozpoznávat konkrétní sacharidy, tzv. molekul vázajících sacharidy (z angl. glycan-binding proteins) [8,9]. Glykanová složka je také součástí lutenizačního a folikuly stimulujícího hormonu, těhotenského lidského choriongonadotropinu, hormonu řídícího produkci

thyreotropinu, thyreotropního hormonu a erythropoetrinu, který řídí produkci červených krvinek v savcích buňkách [7,10]. Zajímavostí je, že po deglykosylaci např. lidského choriongonadotropinu vykazuje tento hormon stejnou afinitu ke svému receptoru, avšak jeho schopnost aktivovat adenylátcyklasu rapidně klesá [8]. Z chemického hlediska je glykanová složka důležitá i pro samotné proteiny, přispívá k jejich stabilitě, sbalení, chrání je před proteolysou, ovlivňuje fyzikální vlastnosti molekuly jako celku, tedy tepelnou stabilitu, rozpustnost, viskozitu, náboj a hmotnost [7,11]. Dále mohou procházet různými modifikacemi i jednotlivé sacharidy v glykanových strukturách, nejdůležitější z nich jsou sulfatace a fosforylace. U proteinů rozeznáváme podle druhu vazby dva hlavní typy, a to N- a O-glykosylaci. (Viz tabulka I) Veškeré monosacharidy vyskytující se v O-glykanech jsou zobrazeny na obrázku č. 1 (str. 13).

1.2 Typy glykosylací

Tabulka I: Přehled základních glykokonjugátů v savcích buňkách [1,6].

Makromolekula	Typ glykosylace	Navázaný glykan
Glykoproteiny	N-glykosylace	N-acetylglukosamin
	O-glykosylace	Mannosa
		N-acetylgalaktosamin
		N-acetylglukosamin
		Fukosa
Proteoglykany		Xylosa
Glykoproteiny	P-glykosylace	Mannosa-1-P
		Xylosa-1-P
		Fukosa-1-P
		N-acetylglukosamin-1-P
	C-mannosylace	Mannosa
GPI pro ukotvení proteinů	glypiace	Mannosa
Glykosfingolipidy	O-glykosylace	Glukosa
		Galaktosa

Zkratky: N-dusík, O-kyslík, P-anorganický fosfát, C-uhlík, GPI-glykosylfosfatidylinositolová kotva

	Galaktosa		Xylosa
	N-acetylgalaktosamin		Kyselina sialová
	Galaktosamin		Kyselina N-glykolylnneuraminová
	Glukosa		Kyselina 2-keto-3-deoxyonová
	N-acetylglukosamin		Fukosa
	Glukosamin		Kyselina glukuronová
	Mannosa		Kyselina iduronová
	N-acetylmannosamin		Kyselina galakturonová
	Mannosamin		Kyselina manurová

Obrázek č. 1: Obecné značení sacharidových jednotek, které se nejčastěji vyskytují v glykokonjugátech, převzato z [1]

Tvar značky označuje vždy stejný počet uhlíků, např. kolečkem se označuje hexa forma sacharidů a jejich anomerů, barvy pak odlišují různé anomerní struktury. Pozn.: ve většině dohledatelných literárních zdrojů se galaktosa a N-acetylgalaktosamin označuje odstínem světle modré.

1.2.1 N-glykosylace

Častější N-glykosylace nastává v polypeptidickém řetězci ve frekvenci aminokyselin v pořadí Asn-X-Ser/Thr, kde X může být jakákoliv aminokyselina s výjimkou prolinu. Na amidický konec asparaginu se přes dusík kovalentně naváže N-glykanová struktura, a vytvoří tak glykosidickou vazbu [11]. Ve vzácných případech se oligasacharidový řetězec může vázat přes arginin [1]. Celý proces začíná na cytoplazmatické straně endoplazmatického retikula, kde vznikají struktury sacharidů vázané na nukleotidy. UDP-GlcNAc se přemění na GlcNAc-1-P a ten je posléze navázán na lipidový přenašeč zvaný dolichol-P. Vzniká dolicholpyrofosfát-N-acetylglukosamin (Dol-P-P-GlcNAc), na který se dále enzymatickou reakcí pomocí specifických glykosyltransferas navazuje další N-acetylglukosamin a pět jednotek mannosy, které opět musí být aktivovány přes nukleotid jim vlastní, např. UDP-Glc, UDP-GlcNAc, GDP-Man a CDP-Sia. Vzniklý $\text{Man}_5\text{GlcNAc}_2\text{-P-P-Dol}$ je přenesen enzymem zvaným flipasa přes dvojvrstvou membránu do lumen endoplazmatického retikula, kde pokračuje přidávání dalších sacharidových jednotek: čtyř mannos a tří glukos pomocí Dol-P-Man, resp. Dol-P-Glc, které pocházejí z GDP-Man, resp. UDP-Glc. Vznikají na cytosolární straně ER a také se dostávají do lumen ER, aby mohly

Man₅GlcNAc₂-P-P-Dol poskytnout potřebný sacharid. Finální podoba navázaného oligosacharidového jádra obsahuje tři molekuly glukosy, devět mannos a dvě molekuly N-acetylglukosaminu, Glc₃Man₉GlcNAc₂. Poté je oligosacharid přenesen pomocí dolicholpyrofosfátu „en bloc“ k asparaginu polypeptidického řetězce, v jednom enzymatickém kroku katalyzovaném komplexem oligosacharyltransferasou, který je složen z mnoha podjednotek. Tento komplex se naváže na oligosacharidDol-P-P ukotvený v membráně, vyštěpí Dol-P-P a přenáší oligosacharid k nativnímu proteinu. Vzniká glykoprotein, který je dále upravován do finální podoby v Golgiho aparátu. Kroky, jakými jsou odštěpování a navazování různých sacharidových jednotek (galaktosy, fukosy, N-acetylglukosaminu a kyseliny sialové) katalyzované glykosidasami, způsobují variabilitu a jedinečnost glykoproteinů, jak funkcí, tak strukturou, která může být dále různě větvená. Nejčastěji se odštěpují tři molekuly glukosy a šest mannos, vzniká tak prekurzor Man₃GlcNAc₂, který je základem všech typů N-glykoproteinů. N-glykoproteiny rozdělujeme podle struktury oligasacharidového jádra na typ s vysokým obsahem mannosy, komplexní a hybridní [11].

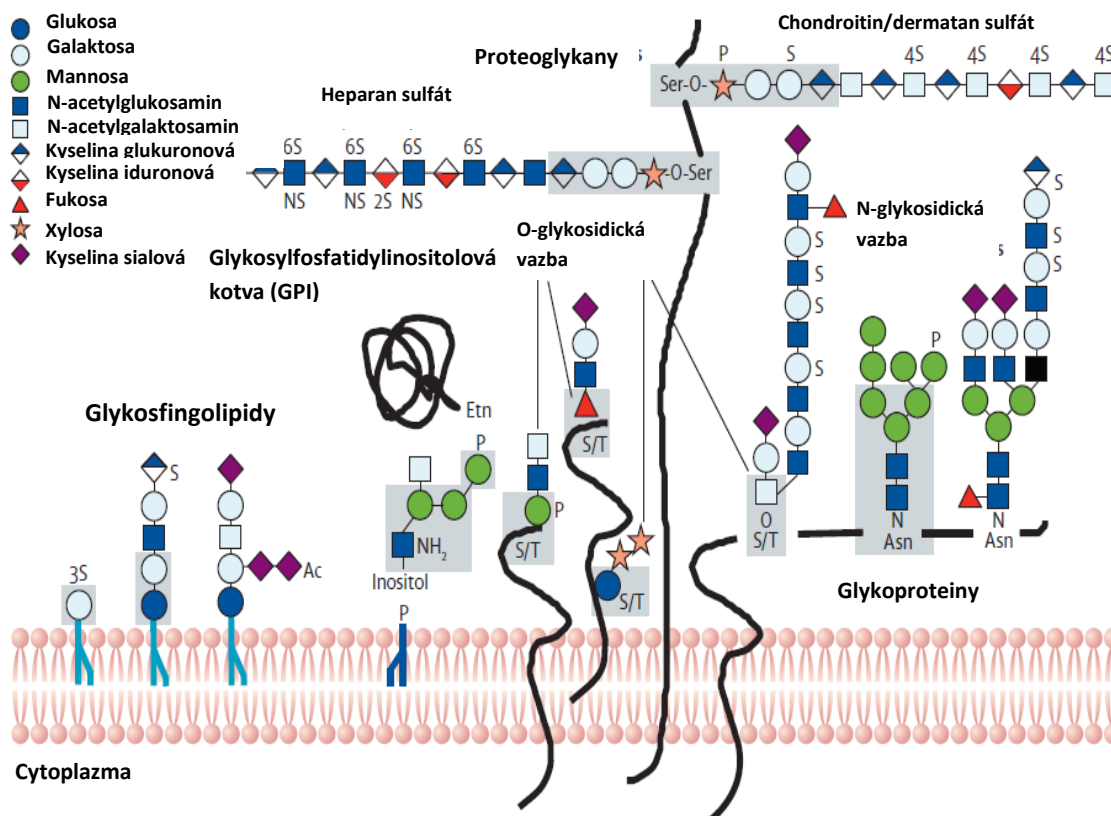
1.2.2 O-glykosylace

O-glykosylace se v savcích buňkách vyskytuje v menší míře, je však mnohem variabilnější v oblasti struktury oligasacharidového řetězce. Na rozdíl od N-glykosylace nepotřebuje k tvorbě glykoproteinů žádné glykosidasy ani lipidový přenašeč (kromě O-mannosylace). O-glykany se nejčastěji váží přes hydroxylový zbytek aminokyselin serinu či threoninu, příležitostně se mohou objevit u tyrosinu, hydroxylysinu a hydroxyprolinu [1]. Poslední dvě jmenované vazby najdeme u některých typů kolagenu [5,6]. Nejčastěji se objevuje vazba s N-acetylgalaktosaminem, těmto glykoproteinům se souhrnně říká muciny, které jsou produkovány mukózními buňkami v dýchacím, trávicím a pohlavně-vylučovacím traktu. Muciny mají funkci lubrikační a ochrannou, jsou užitečné v boji proti lidským patogenům [5,12]. Polypeptidický řetězec se může kovalentně vázat na sacharidové jednotky, jako jsou: xylosa, fukosa, mannos a nebo glukosa. Vazba serinu s xylosou dává vznik glykosaminoglykanům, které jsou hlavní složkou proteoglykanů a vyskytují se hlavně v pojivových tkáních. Jsou jimi heparin, heparansulfát, chondroitinsulfát, dermatansulfát, keratansulfát a kyselina hyaluronová. Chondroitinsulfát a dermatansulfát jsou složeny ze střídajících se jednotek kyseliny glukuronové a N-acetylgalaktosaminu, v heparinu a heparansulfátu se na místo N-acetylgalaktosaminu

vyskytuje N-acetylglukosamin, dále pak kyselina iduronová a její sulfátové estery [13]. Glykany začínající mannosou tvoří důležitou složku ve svalových buňkách, která se nazývá α -dystroglykan. Ten je součástí dystrofin-glykoproteinového komplexu, který tvoří ve svalových buňkách propojení mezi cytoskeletem a extracelulárním matrix [6].

1.2.3 Další typy glykosylace

Dalším méně častým typem je C-mannosylace, nacházející se například v molekule RNasy 2. Tato vazba má charakter C-C vazby, první uhlík pochází z mannosy, která je uvolněna z dolichol-P-mannosy, a druhý je z indolového zbytku tryptofanu. Tato modifikace nastává na prvním tryptofanu při frekvenci aminokyselin W-X-X-W [6]. U glykofosfatidylinositolového spojení s proteinem nenajdeme vazbu mezi proteinem a oligosacharidem, nýbrž se mezi nimi nachází fosfatidylethanolamin. Je to kovalentní propojení mezi fosfatidylinositolem a fosfatidylethanolaminem, který je amidicky propojen s karboxylovou skupinou polypeptidického řetězce. Mezi fosfatidylinositolem a fosfatidylethanolaminem se vyskytují minimálně tři jednotky mannosy a jedna molekula N-acetylglukosaminu, která se často vyskytuje v deacetylované podobě, na tyto cukry mohou být dále navázány další. Tento typ vazby se nazývá glypiace. Protein je ukotven v lipidové dvojvrstvě membrány a vyčnívá do extracelulárního prostředí [14]. Glykosfingolipidy patří mezi skupinu glykolipidů a tvoří početnou skupinu makromolekul v plazmatické membráně. Jsou složeny ze sfingosinu, na který je amidovou vazbou navázána karboxylová kyselina, první uhlík sfingosinu je spojen O-glykosidickou vazbou se sacharidy, nejčastěji glukosou nebo galaktosou, případně s delším oligasacharidovým řetězcem. Jedny z nejdůležitějších glykosfingolipidů jsou gangliosidy, vyskytující se mozkové kůře a periferní nervové soustavě. Mají záporný náboj propůjčený jednou či dvěma jednotkami kyseliny sialové [15]. P-glykosidickou vazbu vytváří aminokyselina serinu polypeptidického řetězce s fosforylovanými sacharidy, jako jsou: mannos-1-P, xylos-1-P, fukos-1-P, N-acetylglukosamin-1-P [1]. Struktury glykokonjugátů jsou znázorněny na obrázku č. 2 (str. 16).



Obrázek č. 2: Přehled základních glykosylovaných struktur v savčích buňkách.

Převzato a upraveno z [4]

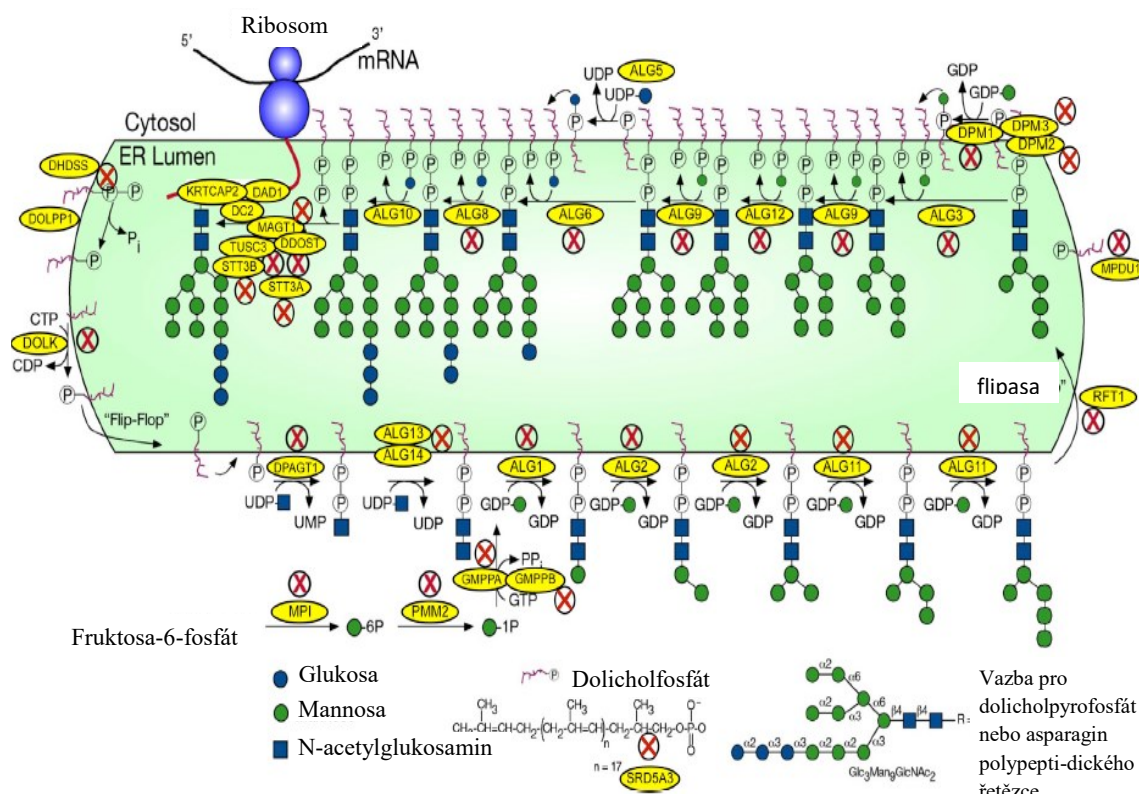
Glykosylované lipidy-glykosfingolipidy a glykosylfosfatidylinositolová kotva a glykosylované proteiny, proteoglykany a glykoproteiny vytvořené v endoplazmatickém retikulu a Golgiho aparátu. Modře jsou znázorněny základní části, tzv. jádra oligosacharidových struktur, ke kterým se dále váží libovolné sacharidy. C-mannosylace a P-glykosylace jakožto další typy glykosylace zde nejsou znázorněny. Zkratky: O-kyslík, N-dusík, S-sulfát, P-anorganický fosfát, Ac-acetyl, S/T-serin/threonin, Asn-asparagin.

1.3 Dědičné poruchy glykosylace

Narušení průběhu glykosylace vede k rozsáhlé skupině onemocnění souhrnně nazvané CDG syndrom (Dědičné poruchy glykosylace, z anglického „Congenital Disorders of Glycosylation“), který je většinou podmíněn autosomálně recesivní dědičností [16]. Ve svém prvopočátku se tato skupina onemocnění nazývala v angličtině Carbohydrate-Deficient Glycoprotein Syndrome, ale později byla přejmenována na CDG syndrom, v jehož názvu jsou zahrnuty všechny typy glykokonjugátů [12]. Tato

onemocnění byla historicky rozdělena do dvou skupin podle lokalizace daného kroku glykosylace v buněčných kompartmentech. CDG typu I zahrnuje poruchy biosyntézy N-glykanů, jako jsou poruchy aktivace sacharidových jednotek pomocí specifických nukleotidů, poruchy v syntéze dolicholpyrofosfátu, poruchy ve fázi prodlužování oligosacharidového řetězce glykosyltransferasou a poruchy transportu endoplazmatickým retikulem přes dvojvrstvou membránu [12]. (Viz obrázek č. 3, str. 18). Do skupiny CDG-II patří poruchy úpravy již vzniklého N-glykoproteinu v Golgiho aparátu. Dále zahrnuje poruchy tvorby vazeb O-glykanů vázaných přes O-mannosu, O-xylosu a O-N-acetylgalaktosamin a poruchy tvorby glykosfingolipidů vázaných přes glukosu a GPI kotvy [16]. Konkrétní typ onemocnění se v prvopočátcích výzkumu označoval malým písmenem, bylo mu přiřazeno takové písmeno podle abecedního pořádku (CDG-Ia, CDG-Ib), v jakém pořadí bylo historicky objeveno. Vzhledem k velkému počtu postupně se objevujících typů CDG bylo zavedeno nové názvosloví, kdy je onemocnění pojmenované zkratkou pro mutovaný gen a dále je přidána koncovka CDG, např. defektní gen pro fosfomannomutasu 2 byl objeven jako první, onemocnění je pojmenováno PMM2-CDG, v původním názvosloví pak CDG-Ia [12]. V případech, kdy není známa genetická podstata onemocnění, se používá označení neznámého syndromu CDG-x [17]. Se změnou názvosloví přišlo i rozšíření dvou původních skupin na čtyři nové. Jsou jimi poruchy v biosyntéze N-glykanů; O-glykanů; GPI kotvy a obecně glykosylovaných lipidů a kombinované poruchy ovlivňující více glykosylačních procesů [18,19]. Příkladem je defekt ve sktruktuře dolichol-P-Man, který má za následek poruchy v N-glykosylaci, O-mannosylaci a také v syntéze GPI kotvy [17].

CDG patří mezi onemocnění, na jejichž terapii zatím nebylo objeveno příliš mnoho účinných léčiv. Má 20% mortalitu během prvních pěti let života, posléze toto procento klesá [16]. Nadějí na vyléčení jsou doplňky stravy v podobě sacharidů, jejichž vznik není v těle možný přirozenou cestou. Avšak jen u ojedinělých typů syndromu se léčba sacharidy ukázala jako úspěšná. Ačkoliv laboratorní testy na zvířatech vykazovaly jisté úspěchy, na skutečné pacienty léčba nezabírala. Ve spoustě případů nastává hromadění meziprojektu, který je u daných onemocnění konečný, jelikož tělo nenachází způsob, jak ho odbourávat. Meziprojekt pak způsobuje toxicitu organismu, spouští boční reakce pro organismus škodlivé nebo naopak blokuje různé enzymy v přirozených metabolických procesech [12].



Obrázek č. 3: Přehled defektů typu CDG-I lokalizované v endoplazmatickém retikulu. Upraveno podle [12]

Poruchy enzymů v průběhu biosyntézy N-glykoproteinů mohou nastat v cytosolární části a v lumen ER, i při přesunu přes endoplazmatické retikulum pomocí enzymu flipasa. Na počátku syntézy figuruje fruktosa-6-P, dolicholfosfát a UDP-N-acetylglukosamin, na který se postupně naváže další N-acetylglukosamin a pět molekul mannosy. Ta je na vznikající oligosacharid přenesena ve formě mannosy-1-P a vzniká buď z fruktosa-6-P, nebo z mannosy, která může být fosforylována na mannosy-6-P a isomerována na mannosy-1-P. Sacharid je přenesen vždy pomocí specifických glykosyltransferas. Každý sacharid musí být aktivován specifickým nukleotidem. Poté se oligosacharyldolicholpyrofosfát přenáší přes dvojvrstvou membránu ER do lumen pomocí enzymu flipasa. Dalším přidáváním v lumen ER sacharidů vzniká struktura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ navázaná na dolicholpyrofosfát, která se pak N-glykosidickou vazbou naváže na N-konec polypeptidu.

Zkratky: UDP-uridindifosfát, UMP-uridinmonofosfát, CTP-cytidylyl trifosfát, CDP-cytidyldifosfát, mRNA-mediátorová ribonukleová kyselina

Počátky výzkumu tohoto onemocnění sahají do roku kolem 1980, kdy byl objeven první pacient s CDG. Dosud bylo identifikováno něco přes 100 typů onemocnění CDG, více než polovina z nich tvoří poruchy glykosylace N-glykoproteinů [17,20]. Tento počet stále stoupá a je zřejmé, že v budoucnu budou objeveny další onemocnění hlavně v oblasti poruchy O-glykoproteinů a glykolipidů, jejichž syntéza je daleko variabilnější a komplikovanější, než je tomu v případě N-glykosylace.

1.3.3 Klinické projevy CDG

Glykoproteiny se hojně vyskytují v lidském těle jakožto struktury s rozdílnými funkcemi. Jejich poškození na úrovni biosyntézy vede k širokému spektru klinických příznaků a má vliv na celou řadu orgánů. Příznaky, které spolu zdánlivě nesouvisí, stěžují identifikaci příčiny vzniku choroby. To je také jeden z důvodů, proč oficiálně trpí CDG řádově tisíce pacientů na celém světě. Ve skutečnosti jich může být daleko více. Mezi nejčastější klinické projevy CDG patří různé neurologické poruchy od psychomotorické retardace po různé intelektuální problémy, poruchy srážlivosti krve, imunitního systému, poruchy vidění, jaterní fibrózy, problémy s funkcí endokrinní soustavy, kardiomyopatie, chronické průjmy a ichtyóza [12,21]. Klinické projevy bývají různě závažné, mohou působit jen lehké změny, v některých případech mají fatální důsledky na celý organismus [19].

1.3.4 PMM2-CDG

Tato choroba patří mezi nejčastější z rodiny genetických onemocnění zapříčiněných nesprávnou tvorbou N-glykanů [22]. Příčinou je mutace genu *PMM2*, jednoho ze dvou genů kódujících enzym zvaný fosfomannomutasa. Ta katalyzuje reverzibilní přeměnu mannosy-6-P na mannosu-1-P. Tato reakce je potřebná na počátku biosyntézy glykokonjugátů, kdy z mannosu-1-P vzniká GDP-mannosa a také dolichol-P-mannosa. Obě látky jsou substrátem pro mannosyltransferasu, která je přenáší k tetradecasacharidovému prekursoru navázanému na dolicholpyrofosfátu $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2\text{-PP-Dol}$, ten je dále přenesen „en bloc“ k polypeptidickému řetězci v endoplazmatickém retikulu, kde dojde k vzniku glykosidické vazby. Nejčastější mutací je mutace R141H, která ovlivňuje aktivní místo enzymu natolik, že mannosu-6-P se není schopná navázat do aktivního místa enzymu. Dochází tedy k hypoglykosylaci řady N-glykosylovaných glykoproteinů. V případě, že u onemocnění chybí kompletně aktivita

fosfomannomutasy, dochází k letálním následkům. Nastává hromadění meziproduktu mannosu-6-P, který způsobí inhibici některých enzymů glykolýzy, způsobuje depleci ATP a aktivuje hexokinasu [12]. Primárně působí na nervový systém, často je přítomna mentální retardace a opožděný vývoj [4]. V další řadě onemocnění způsobuje neprospívání, nefunkčnost jater, poruchy srážlivosti krve, snížený krevní tlak, nesprávnou funkci endokrinní soustavy, tvarové abnormality orgánů jako invertaci prsních bradavek a atypického rozložení tuku, ale také dysmorfii obličeje a strabismus. (Viz obrázek č. 4). U menšiny pacientů se objevuje také lehčí forma onemocnění tohoto typu, kdy mutací není ovlivněno přímo aktivní místo enzymu [4], [12].

a)

b)



Obrázek č. 4: Ukázka některých typických klinických příznaků u PMM2-CDG
a) invertace prsních bradavek, b) atypické rozložení tuku v gluteální oblasti. Převzato z [4].

1.3.5 MPI-CDG

Novějším názvoslovím MPI-CDG, původně syndrom označovaný jako CDG-Ib. Je způsoben sníženou aktivitou enzymu nazývajícím se mannosafosfátisomerasa, kterou kóduje gen *MPI*. Tento enzym katalyzuje přeměnu fruktosy-6-fosfát na mannosu-6-fosfát. Toto onemocnění je jedno z mála, které se dá výrazně léčit podáním mannosy. Mannosa je v těle fosforylována hexokinasou na mannosu-6-P, ta je dále přeměněna na mannosu-1-P fosfomannomutasou. V porovnání s CDG-Ia se u této nemoci neobjevují žádné neurologické abnormality, nýbrž poruchy srážlivosti krve, snížená hladina glukosy, poruchy trávicího traktu jako časté zvracení a průjemy, jaterní fibrózy [12].

1.4 Diagnostika různých forem glykosylace

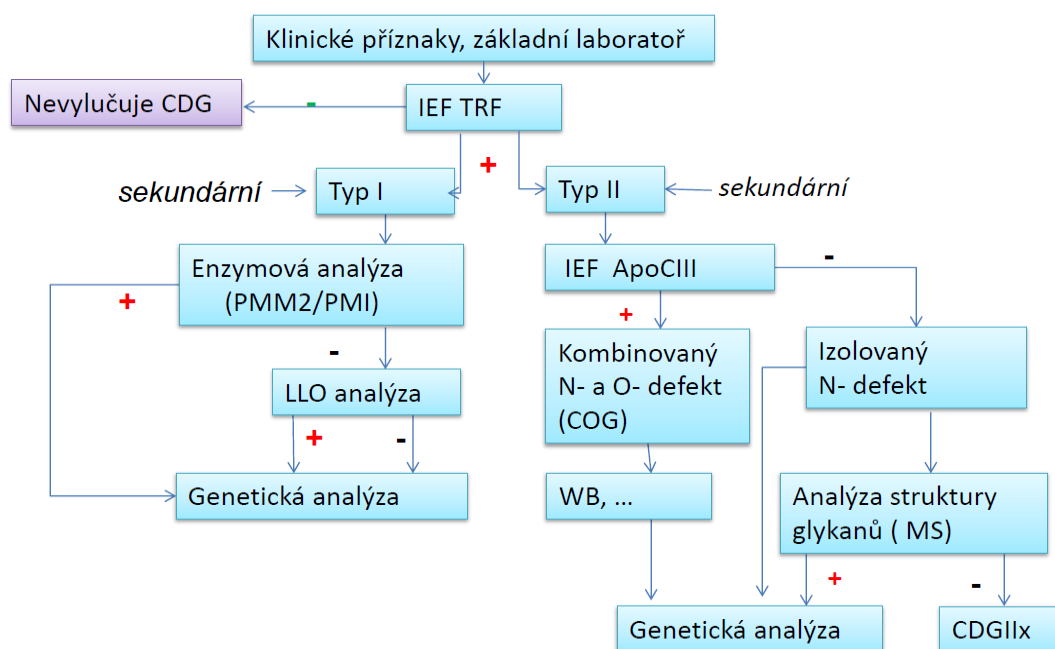
1.4.1 Základní metody

V současné době medicína nemá k dispozici žádnou komplexní biochemickou metodu, která by jednoznačně a přímo určila konkrétní typ CDG. K tzv. „screeningu“ využívá kombinaci více metod, kterými se postupně zužuje široká paleta glykosylačních poruch, posléze dochází k určení konkrétního typu syndromu CDG [19]. Obecný postup, aplikovaný při klinických příznacích vykazujících podezření na onemocnění CDG, je zobrazen na obrázku č. 5 (str. 23). Celé vyšetřování by se dalo rozdělit do několika skupin: klasická analýza biochemických markerů, analýza glykanů; sledování aktivity enzymů a metabolitů; které jsou využívány, resp. vznikají během glykosylace a genetická analýza, která se provádí ve všech případech pro určení finální diagnózy [19].

Prvním krokem je kvalitativní a kvantitativní analýza lidského sérového transferinu pomocí isoelektrické fokusace. K této metodě je zapotřebí pouze několik mikrolitrů krevního séra. Transferin je glykosylovaný protein krevní plazmy, jež je nejdůležitějším přenašečem železa v lidském těle [23]. Glykosylovaných proteinů krevní plazmy je mnoho, ale transferin se ukázal jako nejjednodušší a zároveň nejcitlivější k této metodě [24]. Ve své struktuře nese dva rozvětvené oligosacharidové řetězce, připojené na protein N-glykosidickou vazbou. Jejich rozvětvené konce jsou vždy zakončené kyselinou sialovou, dohromady tedy připadají čtyři jednotky kyseliny sialové na jeden transferin [12]. Kyselina sialová se též nazývá kyselina N-acetylneuraminová a uděluje molekule záporný náboj [25]. Nedostatek záporných nábojů po isoelektrické fokusaci naznačuje vážnou poruchu N-glykosylace, oznamuje buďto absenci celého oligosacharidového řetězce v sekvenci Asn-X-Ser/Thr, nebo oligosacharidový řetězec v pozměněné podobě. Oligosacharyltransferasa, která přenáší oligosacharyldolicholpyrofosfát k nascentnímu proteinu, dává přednost kompletnímu oligosacharidovému řetězci, výsledkem je hypoglykosylace glykoproteinu [12]. CDG-I je tedy charakterizován nekompletním glykanem, zatímco u skupiny CDG-II se obvykle glykany nacházejí v pozměněné podobě [26]. Pokud se isoelektrickou fokusací zjistí nepřítomnost kyseliny sialové, je důvodné podezření na některý z typů CDG-I, následuje tak sledování aktivity enzymů fosfomannomutasy a mannosafosfátisomerasy, nejčastějšího typu, resp. druhého nejčastějšího typu CDG-I [24]. Isoelektrickou fokusací se zjistí zařazení onemocnění v rámci CDG-I a CDG-II. Dále je možné transferin kvantitativně analyzovat pomocí

iontově výměnné chromatografie, kapilární zonální elektroforézy či metodou HPLC (z angl. „High pressure liquid chromatography“). CDG-I byla také diagnostikována pomocí proteinových čipů [9,12,17]. Jako vhodný marker ke stanovení poruch O-glykosylace byl stanoven apolipoprotein C-III, jehož oligosacharidový řetězec se řadí mezi mucinové typy O-glykanů. Isoelektrická fokusace apolipoproteinu C-III je spolu s IEF transferinu doporučený postup při stanovení defektů O- a N-glykanů [27]. Nejúčinnější komplexní metodou je ESI-MS, hmotnostní spektroskopie s ionizací elektrosprejem, která dokáže rozlišit mezi kompletně chybějícím oligosacharidovým řetězcem a jednotlivými chybějícími sacharidy. Diagnosa konkrétních typů může být také potvrzena různými dodatkovými testy, např. u typů syndromu, u kterých se objevuje porucha srážlivosti krve, se vyskytují snížené koncentrace koagulačních faktorů, konkrétně faktoru XI a antithrombinu III, který naopak působí proti koagulaci [28]. U pacientů trpících některým ze syndromů CDG-I je možné detekovat v krvi sníženou koncentraci thyroxin vázajícího proteinu, haptoglobinu, apolipoproteinu B, α_1 -antitrypsinu, β -galaktosidasy a proteinů C a S, které se uplatňují jako antikoagulační faktory. Často se objevují zvýšené aktivity lysozomálních hydrolas [29]. Naopak u CDG-II se objevuje snížená koncentrace faktorů srážlivosti číslo VIII a XII a dále enzymu β -glukuronidasy [30].

Blízká podobnost mezi lidskými geny a kvasinkovými geny dovoluje zkoumat oligosacharidový řetězec vázaný na lipidový přenašeč pomocí studií na kvasinkách. Konzervovanost sledu biochemických reakcí N-glykosylace umožnila objevit identitu většiny typů CDG-I. [12]



Obrázek č. 5: Vyšetřovací schéma při podezření na CDG. Převzato z [31]

PMM2 – fosfomannomutasa 2, MPI – mannosafosfát isomerasa, IEF TRF – isoelektrická fokusace transferinu, LLO – oligosacharid vázaný na lipidový přenašeč, COG – konzervovaná oligomerická podjednotka Golgiho aparátu (z angl. „Conserved oligomeric Golgi complex subunit“), MS – hmotnostní spektroskopie (z angl. „Mass spectrometry“), WB – přenos (z angl. „Western blott“), CDGIIx – neznámý typ syndromu CDG II

1.4.1.1 Sekundární příčiny hypoglykosylace

Účinnost „screeningových“ metod pro CDG může být rušena sekundárními příčinami hypoglykosylace, např. u neléčené galaktosemie, fruktosové intolerance a u pacientů s alkoholovou závislostí. Obecně jaterní onemocnění, různé zánětlivé choroby a nádorové procesy mohou vést k falešně pozitivnímu určení CDG diagnózy. U těchto onemocnění se hromadí meziprodukty, což má za následek sníženou aktivitu, případně i inhibici glykosylačních enzymů [16], [24]. Další nemocí vykazující nestandardní hladinu glykosylace je onemocnění zvané hemolyticko-uremický syndrom, které způsobují bakterie. V případě napadení organismu bakterií *Streptococcus pneumoniae* proteiny podléhají hypoglykosylaci, tyto bakterie produkují neuraminidasu, enzym, který odstraňuje z glykoproteinů koncovou kyselinu sialovou [32,33]. Naopak u některých typů CDG-II, které i když mají pozměněný glykan, IEF TF vykazuje normální profil, dochází tak

k falešně negativním výsledkům. Metodou volby je analýza dalšího glykoproteinu v krvi, např. α_1 -antitrypsinu [16].

1.4.1.2 Prenatální diagnostika

Isoelektrická fokusace sérového transferinu bezprostředně po narození nemusí vždy poskytovat spolehlivý nálezn. Profil separovaných isoform TF je stabilní po dvou až třech týdnech po narození, kdy je možné stanovit případnou hypoglykosylaci transferinu [34]. Prenatální diagnostika se provádí jen v případě, že se onemocnění nachází v rodině, či bylo zjištěno, že jsou oba rodiče recesivními přenašeči genů pro CDG. Nejčastěji se provádí prenatální diagnostika s podezřením na PMM2-CDG a to s využitím molekulárně-genetických metod [19,35].

1.4.1.3 Isoelektrická fokusace

1.4.1.3.1 Isoelektrická fokusace transferinu

Transferin vykazuje významnou heterogenitu, po jeho separaci podle isoelektrického bodu dané isoformy, lze rozlišit až devět transferinových isoform, přičemž mohou být asialované až oktasialované [36]. Principem této metody je elektroforetická separace isoform transferinu v polyakrylamidovém gelu, po které následuje imunochemická detekce (imunofixace) a barvení [23,24]. Variantou je využití agarosového gelu, který je doplněn imunochemickým přenosem na membránu [37]. Separace probíhá za konstantního proudu [38].

Transferin, který je primárně syntetizován v hepatocytech, obsahuje tři strukturální domény. Polypeptidický řetězec, s C- a N-terminální doménou, každá z nich vlastní vazbu s vysokou afinitou pro železité ionty. C-terminální poskytuje dvě místa pro N-glykosidickou vazbu [36]. Oligosacharidové řetězce se mohou lišit ve své struktuře větvením, mohou být bi- tri- nebo tetraantenární [23]. (Viz obrázek č. 6, str. 26). Na hodnotu isoelektrického bodu (pI) mají vliv tři faktory. Jedním z nich je množství záporně nabitých zbytků kyseliny sialové, každá kyselina sialová snižuje hodnotu pI transferinu asi o 0,1 jednotky pH [23,36]. Dalším důležitým faktorem, který ovlivňuje isoformy transferinu, je stupeň nasycení železitými kationty. Každá molekula transferinu může vázat maximálně dva železité ionty [23]. V séru je možné najít čtyři isoformy s rozdílným stupněm nasycení železitými kationty. S každým navázaným kationtem železa klesá hodnota pI transferinu přibližně o 0,2 jednotky pH. Dalším faktorem je genetický

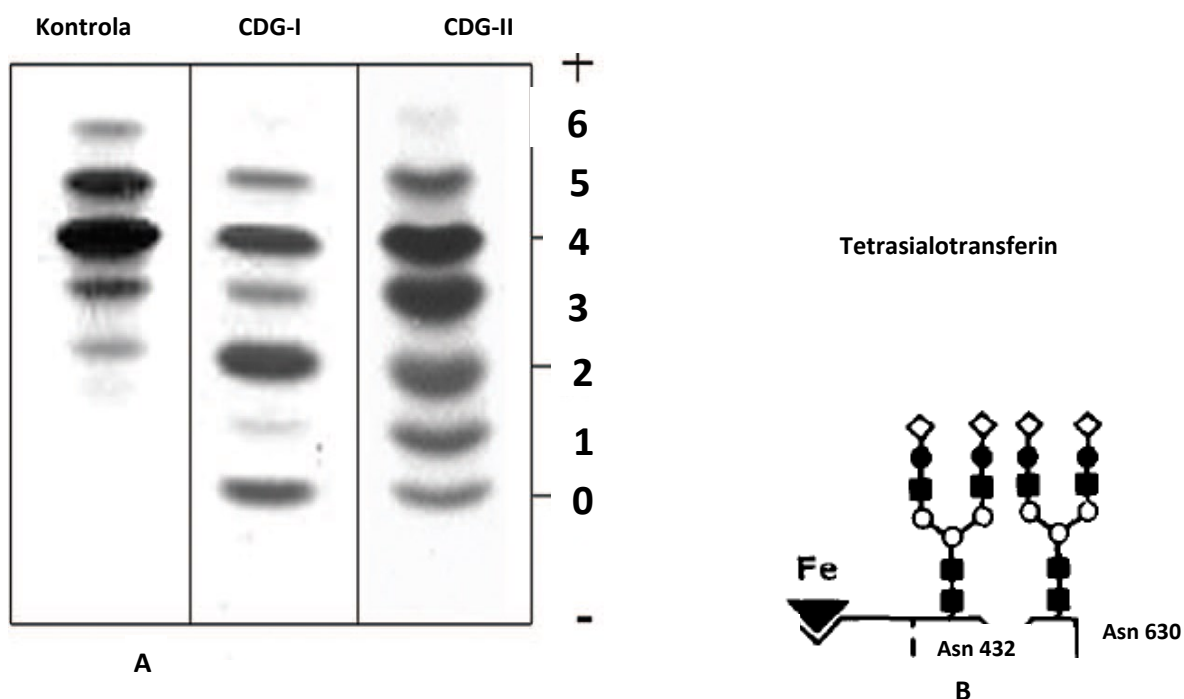
polymorfismus, který může způsobovat změnu molekulové hmotnosti proteinu a který bývá poměrně vzácný [23,36].

U zdravých jedinců se v séru dominantně nachází tetrasialotransferin s isoelektrickým bodem o hodnotě 5,4 [2]. Je to typická isoforma popsaná v úvodu diagnostiky se dvěma rozvětvenými N-glykany zakončenými vždy jedním zbytkem kyseliny sialové. V menším množství je pak možné detekovat pentasialotransferin a hexasialotransferin [23,36]. Typickým profilem pacientů s CDG-I je snížení standardního tetrasialotransferinu, naopak je zde dominantní zvýšená disialoisoforma a částečně i asialoisoforma. Ostatní typické isoformy jako hexasialo- a pentaisoforma jsou zde výrazně potlačené [38]. Skupina pacientů s CDG-I má obvykle podobný profil separace isoform transferinu, nelze z ní však určit konkrétní typ CDG-I [2]. U profilů vyskytujících se u pacientů s CDG-II je typický nárůst všech isoform kromě tetrasialotransferinu v porovnání se zdravými kontrolami. Největší změnu vykazují trisialoisoformy a také monosialoisoforma, která je u zdravých kontrol i u profilu skupiny CDG-I prakticky nedetekovatelná [38]. Některé typy CDG-II nevykazují žádné abnormální profily transferinu, a je tak nutné přistoupit k jiné metodě detekce odlišností glykanů [12]. Jednou z možných je isoelektrická fokusace apolipoproteinu C-III [38,39].

IEF TRF slouží i k monitorování léčby. Například při úspěšné léčbě pomocí orálně podávané mannosy u onemocnění CDG-Ib se klinické příznaky zmírní či zmizí velmi rychle, zlepšený profil isoform transferinu je však detekovatelný až po několika měsících [2,40].

Pro stanovení defektů N-glykosylace je nutné transferin nasytit železitými ionty, abychom měli jistotu, že všechny vzniklé isoformy budou saturované a nebudou tak ovlivňovat hodnotu pI. Na výsledek by tak mělo mít vliv pouze množství záporně nabitých zbytků kyseliny sialové [36]. Saturace se v praxi provádí saturační směsí citranu železitého a hydrogenuhličitanu sodného v poměru 2:1, která je přidána ke vzorku a reakce probíhá při alespoň 30 minutové inkubaci [41]. Vliv genetického polymorfismu na transferin je při abnormálním profilu dodatečně zkoumán po inkubaci saturovaného transferinu železem s neuraminidasou, která odstraní případné zbytky kyseliny sialové, opět pomocí isoelektrické fokusace [38]. Rozdílnost jiné genetické varianty proteinu je dána změnou isoelektrického bodu. Nejčastěji se vyskytuje genetická varianta C, méně běžná je pak anodická varianta B a katodická varianta D. V případě, že jedinec disponuje variantou C nebo D, může profil separace IEF TF vést k nesprávnému určení diagnózy. Proto je

za předpokladu podezřelého profilu vhodné provést IEF TF znovu za inkubace vzorku s neuraminidasou, po které by výsledný profil měl detekovat pouze asialoisoformy TF. V případě jiné genetické varianty než je varianta C, se budou objevovat i jiné isoformy [42,43]. Imunochemická detekce po ukončení elektroforetické separace se v praxi provádí nanášením protilátky proti lidskému sérovému transferinu, např. polyklonální králičí protilátky, rovnoměrným nanášením přímo na gel. Následuje hodinová inkubace s protilátkou a poté promývání NaCl za účelem vymytí neprecipitovaných proteinů. Posledním krokem je barvení gelu roztokem Coomassie brilliant blue. Výsledek separace je možné odečíst kvalitativně pouhým okem [41]. Kvantitativní zastoupení jednotlivých sialoforem TF se provádí pomocí denzitometrie [24]. Existují vzácné typy CDG, u kterých je stupeň sialylace transferinu v pořádku, jejich profil se tak jeví nezařaditelný do žádné ze skupin CDG. V tomto případě se provádí analýza transferinu kapilární zónovou elektroforézou a HPLC, které umějí rozpoznat pozměněný oligosacharidový řetězec [19,44–46].



Obrázek č. 6 A: Profily separovaných isoform transferinu po isoelektrické fokusaci zdravé kontroly a pacientů s CDG upraveno podle [38]; B: struktura glykanu tetrasialotransferinu, upraveno podle [36,47]

První dráha u obr. A vyjadřuje profil zdravých jedinců využitých pro kontrolu, druhá obsahuje profil pacienta trpícího typem syndromu CDG-I a třetí profil pacienta s CDG-II. Čísla vpravo značí isoformy podle počtu sialových zbytků.

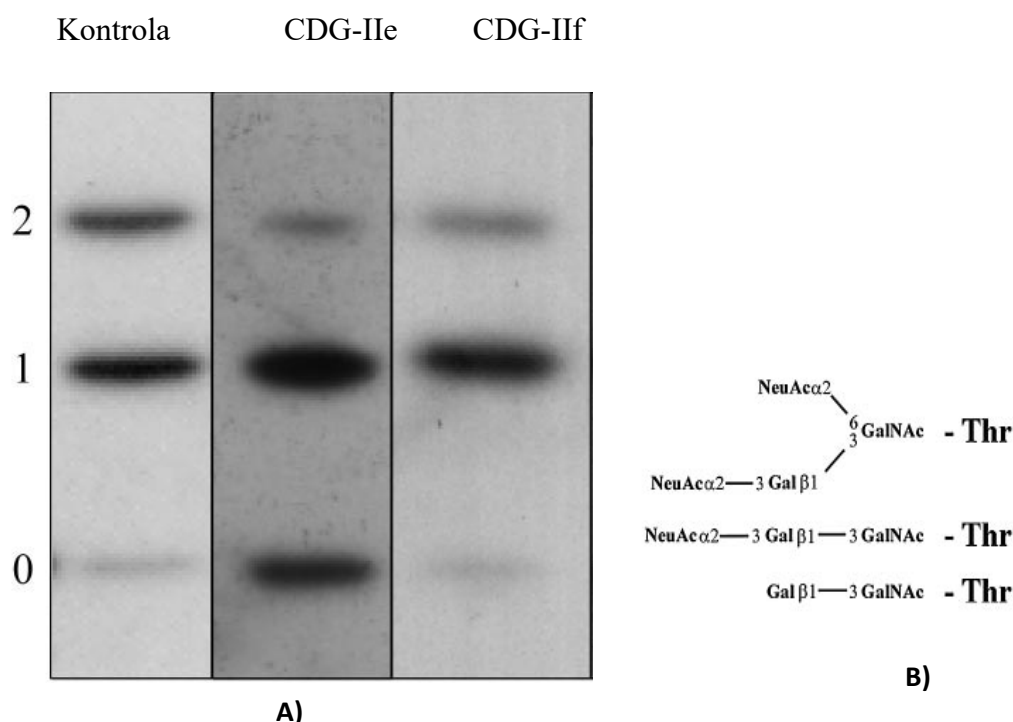
1.4.1.3.2 Isoelektrická fokusace apolipoproteinu C-III

Apolipoprotein C-III patří mezi stabilní glykoproteiny krevní plazmy. Disponuje O-glykosidickou vazbou, ve které je vazba threoninu na N-acetylgalaktosamin, pokračující oligasacharidovým řetězcem, jehož základem je jedno tzv. mucinové jádro [33,38]. (Viz obrázek č. 7, str. 28). IEF ApoCIII se používá při podezření na poruchu v syntéze O-glykoproteinů mucinového typu [27]. Kyselina sialová zde taktéž tvoří terminální monosacharid. Podle počtů jejích zbytků u ApoCIII lze rozpoznat až tři isoformy, z nichž jedna je asialovaná, ApoCIII₀, další mohou být mono- či disialované, ApoCIII₁, ApoCIII₂ [38]. Princip metody je, stejně jako u IEF TF, založen na separaci isoform apolipoproteinu C-III krevní plazmy za konstantního proudu. Po elektroforetické separaci následuje imunochemický přenos – „Western blott“ za pomoci primární protilátky proti lidskému ApoCIII a sekundární protilátky, která je konjugovaná s peroxidasou. Následuje detekce různými osvětlovacími technikami, např. fluorescenčně nebo luminiscenčně pomocí luminolu. Následuje vyhodnocování intenzity jednotlivých proužků, tzv. bandů, které značí konkrétní isoformy pomocí počítačových programů [33,48]. V případě hypoglykosylace se výsledný profil charakterizuje posunem směrem k záporné katodě [49]. Naopak při hyperglykosylaci je profil posunut ke kladné anodě [27].

Zastoupení jednotlivých isoform apolipoproteinu C-III se mění v závislosti na věku jedince [27,33]. Podle hladin ApoC-III lze populaci rozdělit na tři skupiny. Do prvního roku života je hladina asialované formy ApoC-III velmi nízká, pohybuje se lehce nad nulovou hodnotou, v průběhu života postupně narůstá na přibližně na 8%. Každá hladina konkrétní isoformy je však velmi individuální, pohybuje se kolem 20%, u asialoisoformy je nižší. Koncentrace monosialoisoformy ApoC-III také během života téměř konstantně narůstá, průměrná hodnota se pohybuje kolem 50%. Nejdynamičtější pohled je na vývoj disialované formy, která během prvního roku života roste, okolo 50%, poté se zastaví a hladina konstantně klesá. Do 18. roku života se koncentrace disialoapolipoproteinu C-III pohybuje kolem 42%, následující roky dále klesá přibližně na 36% [33].

I v případě apolipoproteinu C-III existuje možnost výskytu genetického polymorfismu. Při jeho podezření je vzorek opět nutné analyzovat pomocí neuraminidasy, která odstraní všechny zbytky kyseliny sialové. Po inkubaci a následné separaci by měla být detekována pouze asialoisoforma ApoC-III, v případě genetického polymorfismu by však

i po inkubaci vzorku s neuraminidasou byl profil IEF ApoC-III nestandardní a profil by vykazoval i jiné isoformy [33].



Obrázek č. 7: A) Profily separovaných isoform apolipoproteinu C-III po isoelektrické fokusaci zdravé kontroly a dvou pacientů s poruchou O-glykosylace, upraveno podle [27,50]; B) struktura trisialovaného glykanu u apolipoproteinu C-III, převzato z [27].

V první dráze obr. A) se vyskytuje profil zdravé kontroly. Druhá dráha patří profilu pacienta s typem CDG-IIe, kde lze pozorovat rapidní vzrůst asialoisoformy i monosialoisoformy Apo C-III. Naopak disialoisoforma Apo C-III značí hyposialilaci. Ve třetí dráze je profil pacienta s typem CDG-IIIf, který má zvýšenou koncentraci monosialoisoformy a sníženou disialoisoformy Apo C-III. Čísla vlevo značí konkrétní isoformu podle počtu zbytků kyseliny sialové. Zkratky: NeuAc – kyselina neuraminová, Gal – galaktosa, GalNAc – N-acetylgalaktosamin, Thr – threonin

1.4.1.4 Měření aktivity enzymů

Nejčastěji se provádí enzymová analýza fosfomannomutasy (onemocnění PMM2-CDG). Měření se provádí na izolovaných lymfocytech nebo na kultivovaných kožních fibroblastech. Jako substrát se používá mannos-1-fosfát a měření probíhá spektrofotometricky jako přeměna koenzymů NADP^+ na NADPH. Pokud aktivita

fosfomannomutasy vykazuje standardní hodnoty, dalším krokem vedoucím ke zjištění hledaného onemocnění je sledování enzymové aktivity mannosafosfátisomerasy (onemocnění PMI-CDG) podobným způsobem jako u PMM2, substrátem je zde mannososa-6-fosfát. Při používání kožních fibroblastů byly zjištěny vyšší hodnoty aktivity fosfomannomutasy 2 než při měření pomocí lymfocytů [22]. Proto je doporučeno provádět tuto metodu na izolovaných lymfocytech. Pokud klinické příznaky naznačují přítomný defekt u enzymu MPI, je možné stanovovat jeho aktivitu jako první v pořadí [24]. Pro měření aktivity enzymů ostatních typů CDG je nutno vypěstovat kultivované kožní fibroblasty [2]. Dále se metoda měření aktivity enzymů využívá u některých typů O-glykosylace [19].

1.4.1.5 Molekulární diagnostika

Genetická analýza je zkoumána vždy za účelem potvrzení předpokládané mutace, či v případě, že žádná z biochemických a analytických metod neurčila konkrétní typ CDG. Doposud bylo popsáno více než 100 genů, jejichž mutace mohou způsobovat defekty v procesu biosyntézy glykoproteinů. Analýzu je možné provést sekvenováním DNA, polymerasovou řetězovou reakcí v reálném čase (PCR Real-Time nebo také qPCR), analýzou polymorfismu konformace jednovláknové DNA nebo metodou, která studuje polymorfismus délky štěpných fragmentů. V posledních letech k identifikaci podstaty onemocnění přispívá využití celoexomového sekvenování [19].

1.4.1.5.1 qPCR

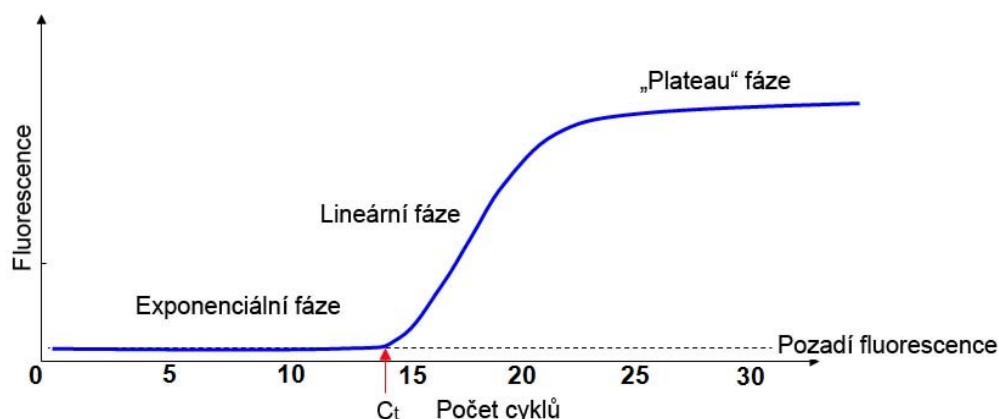
qPCR je kvantifikační variantou klasického PCR, kdy je sledováno množství množící se DNA pomocí fluorescenční látky, např. v podobě fluorescenční sondy. Ta se přidává do polymerační směsi a po navázání se na DNA vyzařuje fluorescenci, která je kontinuálně zaznamenávána v průběhu celé PCR. Dnes se více využívá pojmenování qPCR (z angl. „quantification“), jelikož zkratka RT (z angl. „Real-Time“) by mohla být zaměněna např. s reverzní transkripcí. Využívá se při analýze chromosomových aberací, analýze genové exprese, pro detekci patogenů a při detekci polymorfismu u nukleotidů [51].

V průběhu celé qPCR se neustále opakuje fáze „denaturace“ - děj, kdy je nejprve šroubovice DNA rozpletena, následuje fáze nasedání primerů na obě rozpletená vlákna. V tomto mechanismu se pravděpodobně polymerasa naváže na primer a tento komplex je

poté navázán na jednovláknovou DNA a v další fázi již probíhá syntéza nové dvoušroubovice. Tyto fáze jsou regulovány teplotami pro dílčí děj PCR, při denaturaci je potřeba vysoká teplota, kolem 95°C, pro nasedání primerů je teplota snížena na přibližně 50°C a pro polymeraci je opět navýšena na teplotu 72°C, která je specifická pro danou polymerasu. Z jednoho templátu vznikají tedy dvě nové DNA, při kontinuálním opakování tohoto děje roste počet nových DNA rychlostí 2^n . V ideálním případě, tj. při 100% efektivitě, by počet vytvořených genů byl kvantifikován podle vzorce E^n , kde n značí počet cyklů a za veličinu E se v tomto případě dosazuje hodnota 2, jelikož počet procent dělený 100 se vždy přičítá k hodnotě 1. Za předpokladu 90% účinnosti reakce vznikne menší množství genů a výpočet je stanovován jako $1,9^n$ [51,52].

Při vyhodnocování se u každého vzorku pracuje s hodnotou C_t , která značí tzv. prahovou hodnotu cyklu (z angl. „cycle of threshold“), kdy množství fluorescence dosáhne hodnoty nad práh pozadí a od té doby roste lineárně až do vyčerpání některého z komponentů reakce, nejčastěji oligonukleotidů, čímž je PCR ukončeno a nedochází již k žádnému množení DNA. (Viz obrázek č. 8, str. 31). Hodnota C_t by měla být ideálně stanovena do 30. cyklu, v případě, že je tato hodnota příliš vysoká, je to důsledek malého množství templátové DNA. Další důležitou veličinou je efektivita reakce, která se poté zohledňuje při výpočtu celkové exprese. K výpočtu exprese konkrétního genu u daného vzorku se poté využívá vzorce č. 1 (str. 31), který zahrnuje hodnotu C_t , efektivitu reakce a je zároveň odečten od hodnot referenčních genů [51,52].

Do reakční směsi se přidává templátová DNA, směs oligonukleotidů, fluorescenční substrát a dále jeden ze dvou druhů genů, které plní funkci primerů. Prvními jsou ty, jejichž exprese má být analyzována, druhým typem genů jsou geny srovnávací, jejichž vytvořený počet kopií by měl být stejný u všech testovaných vzorků. Srovnávací geny slouží k odečtení pozadí reakce a zároveň jsou využívány jako kontrola, že reakce proběhla správně a ve směsi nebyly přítomny žádné inhibitory [48].



Obrázek č. 8: Křivka nárůstu DNA během qPCR, převzato z [51,52].

Během exponenciální fáze nejprve dochází k nárůstu DNA, ne však takovému, aby hodnota fluorescence, která reflektuje množství DNA, přesáhla hodnotu pozadí. S rostoucím množstvím DNA je překročena prahová hodnota, tento bod je charakterizován veličinou C_t , a exponenciální fáze se postupně mění na lineární, kdy je množství DNA tak velké, že fluorescence roste lineárně. S ubýváním reakčních komponentů, nejčastěji oligonukleotidů, nastává tzv. plateau fáze, kdy se postupně zmenšuje množství rostoucí DNA, až se všechny oligonukleotidy vyčerpají, čímž je celé qPCR ukončeno. Zkratky: C_t -prahová hodnota cyklu

Vzorec č. 1: Výpočet exprese genu pro vzorek templátu, převzato z [51,52].

$$\frac{[N_0]_A}{[N_0]_B} = (1 + E)^{C_{tB} - C_{tA}}, \quad (1)$$

kde N_0 vyjadřuje množství původní RNA, E značí efektivitu dané reakce, A označuje sledovaný gen a B gen referenční, C_t pak vyjadřuje počet cyklu, kdy hodnota fluorescence přesáhne hodnotu pozadí.

1.4.2 Výzkumné metody

1.4.2.1 Hmotnostní spektroskopie

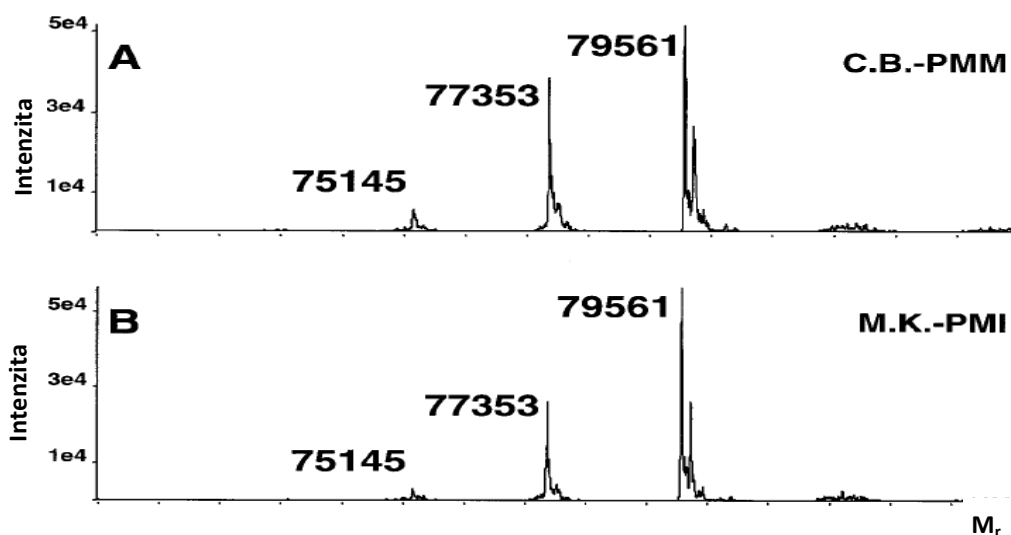
Hmotnostní spektroskopie je zřejmě nejkomplexnější metodou pro diagnostiku CDG [3]. Poskytuje informace o detailních strukturních změnách glykoproteinů [26]. Pracuje se sérovým glykoproteinem, který může být v nativním stavu nebo izolován pomocí imunoafinitní chromatografie [24]. Podobně jako IEF i hmotnostní spektroskopie

nejčastěji využívá k analýze sérový transferin. Důležitou charakteristikou je jeho hmotnost, která činí u proteinové části 75 181 Da, každý další navázaný oligosacharidový řetězec, který je dále rozvětvený na dvě větve, je charakterizován molekulovou hmotností 2 206 Da. Standardní transferin u zdravých kontrol se dvěma rozvětvenými oligosacharidovými řetězci by měl mít hmotnost 79 593 Da [3]. Pro analýzu velkých molekul, jakými glykoproteiny bezesporu jsou, se využívají tři typy hmotnostní spektroskopie. Hmotnostní spektrometrie založená na ionizaci elektrosprejem, ESI-MS (z angl. „electrospray ionization - mass spectrometry“), kdy je vzorek vystaven silnému elektrickému poli a proudu dusíkového plynu. Tento proces zapříčiní evaporaci a postupné uvolňování nabitých iontů analytu směrem k detektoru. Dalším druhem je MALDI-MS (z angl. „matrix-assisted laser desorption/ionization - mass spectrometry“) charakterizována ionizací analytu laserem za použití matrice. Tou jsou krystaly absorbující v ultrafialové oblasti. Matrice spolu s analytem jsou vystaveny vysokoenergetickému laseru, který způsobí ionizaci a následné uvolňování nabitých iontů analytu. V posledních letech se začala využívat k analýze glykoproteinů také SELDI-MS (z angl. „surface enhanced laser desorption/ionization - mass spectrometry“). Tato metoda je založena na imobilizaci glykoproteinu označeného protilátkou na reaktivním povrchu proteinové čipové sondy. Zatímco analýzu glykoproteinů pomocí ESI-MS a MALDI-MS je možné aplikovat při podezření na obě základní skupiny CDG, SELDI-MS je použitelné pouze k diagnostice CDG-I [24,53,54]. K detekci konkrétních isoform se využívá buď iontová past nebo tzv. kvadrupólový analyzátor, které bývají spojovány s ESI-MS, MALDI-MS a SELDI-MS obvykle využívá detektor měřící dobu letu, TOF, (z angl. „time of flight detector“) [24,54].

1.4.2.1.1 ESI-MS

ESI-MS se standardně využívá při podezření na syndrom CDG-I [55]. Vzorek je nejprve rozpuštěn v nadměrném množství rozpouštědla, tato směs je poté vedena kovovou kapilárou, která je vystavena vysokému napětí. Napětí způsobuje rozprašování kapaliny ve formě nabitého aerosolu. Rozpouštědlo se postupně odpařuje a zvyšuje se tak hustota náboje, což vede k výbuchu a rozpadu na malé částice. V ředěné plynné fázi postupně vznikají samostatné ionty bez molekul rozpouštědla za současného přidávání plynu, který pomáhá ionizovaným částicím při odpařování rozpouštědla. Takto se vytváří svazek iontů vhodný k hmotnostní analýze [56]. Výsledkem této metody je hmotnostní spektrum

s mnoha vrcholy, které charakterizují konkrétní isoformy transferinu. Identifikace ionizovaných glykoproteinů je založena na poměru m/z , tedy poměru mezi hmotností a nábojem. Hmotnost isoform je pak porovnávána s hmotností zdravých kontrol, která má vždy větší hmotnost v porovnání s pacientem CDG-I, který postrádá jeden nebo více oligosacharidových řetězců [55]. Jelikož jsou hodnoty poměru m/z u dvouřetězcového, jednořetězcového i chybějícího oligosacharidu velmi podobné, je praktičtější pozorovat změny hmotnosti přepočtené pomocí algoritmu na relativní molární hmotnost [3]. V případě nejčastějšího typu PMM2-CDG bývá transferin ve velkém množství detekován s jedním řetězcem, který bývá disialovaný, tedy rozvětvený, nebo oligosacharidový řetězec kompletně chybí a transferin je tedy asialovaný [54]. Touto spektrometrií jsou generovány vícenásobně nabitě ionty, které jsou pro zjednodušení dekonvolucí převedeny na jednonásobně nabitě nebo neutrální ionty [57]. Poměr m/z je poté přepočítáván na výslednou relativní molární hmotnost. Jelikož každý druh spektroskopie generuje jiné druhy iontů, hodnoty poměrů m/z jsou z tohoto důvodu velmi odlišné. Výhodou této chromatografie je, že není potřeba sytit transferin železitými kationty. Rozmezí m/z , kterého dosahuje analyzovaný transferin je 2000 až 3000, minimální naměřitelná hmotnost je 74 000 Da (hmotnost proteinu), maximální je pak 81 000 Da (standardní hmotnost transferinu) [54]. Výhodou ESI-MS je potřeba malého množství vzorku (přibližně 10 μ l), krátká doba analýzy (9 minut) a schopnost rozlišit strukturální změny v glykoproteinu, jakožto i rozlišení CDG v rámci dvou základních skupin. Nevýhodou je cena přístroje, která je neporovnatelná s náklady na IEF. Další nevýhodou je nerozpoznání malých rozdílů v hmotnosti, které mohou hrát roli v genetickém polymorfismu [24]. Chromatogramy dvou nejčastějších typů CDG jsou znázorněny na obrázku č. 9 (str. 34).



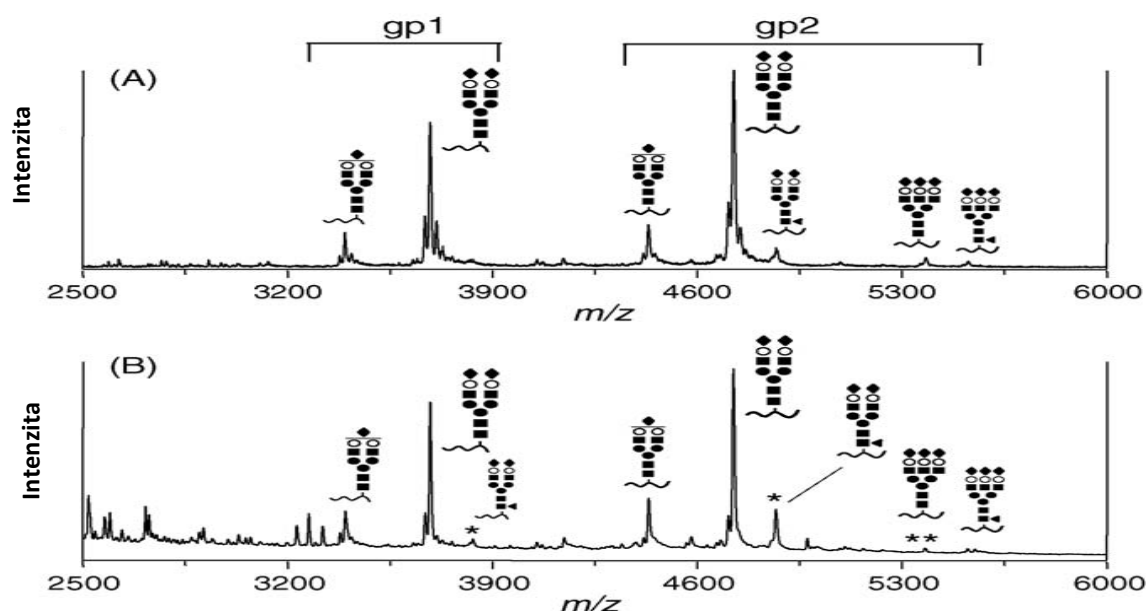
Obrázek č. 9: Chromatogramy sérového transferinu dvou nejčastějších typů CDG po LC-MS, převzato z [54].

Chromatogram A charakterizuje analýzu pacienta PMM2-CDG, chromatogram B MPI-CDG. Osa y vyjadřuje intenzitu signálu, osa x pak relativní molární hmotnost. Na chromatogramu jsou pozorovatelné tři rozlišitelné vrcholy. Vrchol s nejvyšší hodnotou relativní molární hmotnosti označuje tetrasialotransferin se dvěma rozvětvenými oligosacharidovými řetězci, hmotnost 77 353 Da značí ztrátu jednoho oligosacharidového řetězce a hmotnost 75 145 Da poukazuje na chybějící glykan.

1.4.2.1.2 MALDI-MS

Pro analýzu molekul přesahujících hmotností 10 kDa je využíván TOF analyzátor, který měří dobu letu vygenerovaného jednonásobně nabitého iontu. Matrice je spolu se vzorkem v pevném skupenství umístěna v elektrickém poli na vhodném nosiči, např. nerezové destičce, po excitaci laserového pulzu matricí se matrice rozloží a tím ionizuje daný vzorek. Matrice je během tohoto procesu potřebná proto, aby nedošlo k rozštěpení vzorku za účinku laseru. Cesta iontů je urychlená elektrickým polem, které je vháněno přes uzemněnou mřížku do trubice s vakuem. Doba letu částice je závislá na její velikosti a hmotnosti, po zjištění doby průletu vakuovou trubicí se čas přepočítává na rychlost, ze které je možné vypočítat poměr hmotnosti a náboje, m/z [3,58]. Touto metodou lze analyzovat vzorky sérového transferinu za účelem diagnostiky CDG-I i CDG-II. MALDI-MS předchází imunoafinitní chromatografii. Hmotnostní analýza transferinu však kvůli obrovské hmotnosti molekuly nerozezná defekty na úrovni jedné sacharidové jednotky. Ty lze identifikovat analýzou glykanů uvolněných z transferinu nebo jiných glykoproteinů pomocí MALDI-MS. Nejprve je třeba enzymatického uvolnění

glykanu, které je doplněné hydrofilní afinitní chromatografií. Touto analýzou transferinu bylo zjištěno, že defekty ve struktuře oligosacharidových řetězců závisí i na poloze aminokyseliny v polypeptidickém řetězci, se kterou vytváří N-glykosidickou vazbu [3], [59]. Tyto změny ve struktuře transferinu jsou znázorněny na obrázku č. 10.



Obrázek č. 10: Hmotnostní spektrum glykanů sérového transferinu metodou MALDI-TOF, převzato z [3]

Chromatogram (A) označuje kontrolu, chromatogram (B) pacienta s neznámým typem CDG-Ix. * je označená fukosylace, ** větvení oligasacharidového řetězce na tři další. Gp1 charakterizuje oligosacharidový řetězec v poloze Asn-432, gp2 pak řetězec v poloze Asn-630. V poloze aminokyseliny Asn-630 byla prokázána zvýšená fukosylace a také častější rozvětvení řetězce na tři další oligosacharidové řetězce. V poloze Asn-432, kde se objevuje snížený výskyt fukosylace, obecným znakem skupiny CDG-I je právě zvýšená fukosylace a snížené větvení [3], [59].

1.4.2.6 Další možnosti analýzy

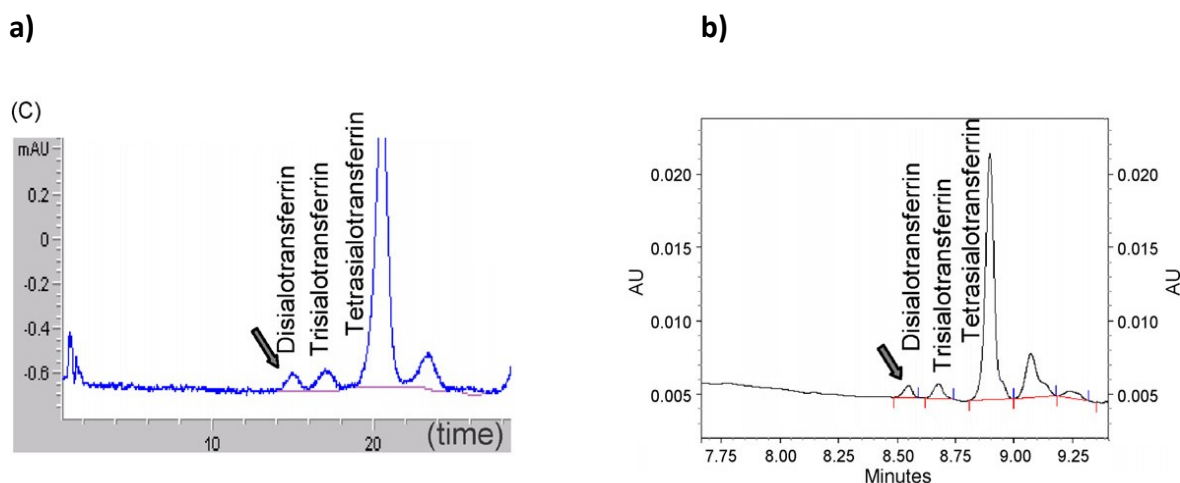
V dalších krocích vedoucích k určení diagnózy konkrétního typu CDG se využívá analýza částí glykoproteinů jako LLO (z angl. „lipid-linked oligosaccharides“) a PDO (z angl. „protein-derived oligosaccharides“), které by bylo možné interpretovat jako oligosacharidy vázané na lipidový dolicholfosfát, resp. oligosacharidy vázané na protein. Tato analýza se provádí izolací z kultivovaných fibroblastů, které se nejdříve inkubují s ^3H -mannosou po dobu 30 minut, následně je provedena extrakce chloroformem

a methanolem v poměru 2:1. Během tohoto procesu se uvolní dolichol-P-mannosa do supernatantu, přidáním vody se pak dále uvolňují volné oligosacharidy, mannosy-P a sacharidové nukleotidy. Usazená peleta je poté znovu extrahována chloroformem, methanolem a vodou, dochází tak k uvolnění cíleného LLO a analýze na HPLC. Tento postup se využívá při podezření na onemocnění CDG-I, kdy analýza sérového transferinu vykazovala profil separovaných isoformů zařazující tohoto pacienta do této skupiny, a dále byly stanoveny aktivity enzymů PMM2 a MPI jako standardní. Ve druhém případě, při podezření na CDG-II se analyzuje struktura PDO. Přidáním specifických endoglykosidas, v případě transferinu endoglykosidasy PNGAsy F, celým názvem N-glykosidasa F, která hydrolyzuje vazbu mezi N-acetylglukosaminem a asparaginem, vzniká deaminizovaný polypeptidický řetězec a uvolněný oligosacharidový řetězec v supernatantu (PDO). V případě O-glykoproteinů, i kvůli velké variabilitě vazeb mezi glykany, nebyla zatím objevena žádná specifická endoglykosidasa. V praxi je možné použít složitější chemické pochody, jako jsou hydrazinolýza nebo β -eliminace. Analýza uvolněných oligosacharidů se provádí vysokotlakou metodou HPLC nebo v případě CDG-II lze glykany analyzovat pomocí MALDI-TOF [2,4,19,24,60–62].

1.4.2.7 HPLC a CZE

Variantou ke „screeningu“, jež je založený na IEF transferinu, jsou chromatografické metody HPLC (vysokoúčinná kapalinová chromatografie) a CZE (kapilární zónová elektroforéza). V porovnání s IEF jsou tyto chromatografické metody méně citlivé k analýze glykoproteinů, zároveň ale dokážou přesněji kvantifikovat isoformy daného vzorku [24]. Jsou vhodné hlavně k diagnostice mírnějších forem CDG, které jsou pro IEF TF sice viditelné, ale velmi těžko kvantifikovatelné. Další výhodou je nepotřebné značení protilátkami a také to, že jsou tyto metody alespoň částečně automatické [24,44]. Naopak nevýhodou je cena kolon, jejich potřeba regenerovat a také potřeba velkého množství vzorku v řádu stovek mikrolitrů, v porovnání s IEF. Proto je dobré využívat tuto metodu při analýze velkého množství vzorků [19,24]. Při CZE se nejprve vzorek se sérovým transferinem nasytí železem, poté je aplikován do křemenné kapiláry se silanolovou skupinou, ke které je připojeno detekční zařízení měřící absorpční. V tomto případě se měří v UV oblasti kolem 200 nm. Celým systémem protéká roztok elektrolytu, pufru. Na elektrody je vkládáno konstantní napětí, které způsobuje pohyb směrem ke katodě a následnou separaci isoformů podle jejich náboje [44,45]. Pro přípravu

HPLC je potřeba vzorek sérového transferinu opět kompletně nasytit železem, oddělit precipitací od lipoproteinů a následně přefiltrovat. Poté je vzorek vstříknut do systému HPLC, který je složený z chromatografu se čtyřnásobnou pumpou, jednotky k odplynění, iontové výměnné chromatografické kolony, detektoru měřícího absorbanci, termostatovaného dávkovače vzorků a vyhodnocovacího softwaru. Plně satureovaný transferin má absorpční maximum ve vlnové délce přibližně 470 nm. Uvolnění se provádí pomocí gradientové eluce [63]. Kvantifikace je u obou metod příslušnými softwary odečtena z výsledného chromatogramu jako plocha pod křivkou a isoformy jsou tak procentuálně kvantifikovány v čase. Dle dostupných studií jsou obecně výsledky kvantifikace pomocí HPLC a CZE velmi podobné, v případě disialotransferinu je jeho množství mírně vyšší metodou HPLC, procentuální rozdíly jsou zde statisticky významné [44]. Ukázkové chromatogramy obou metod jsou znázorněny na obrázku č. 11



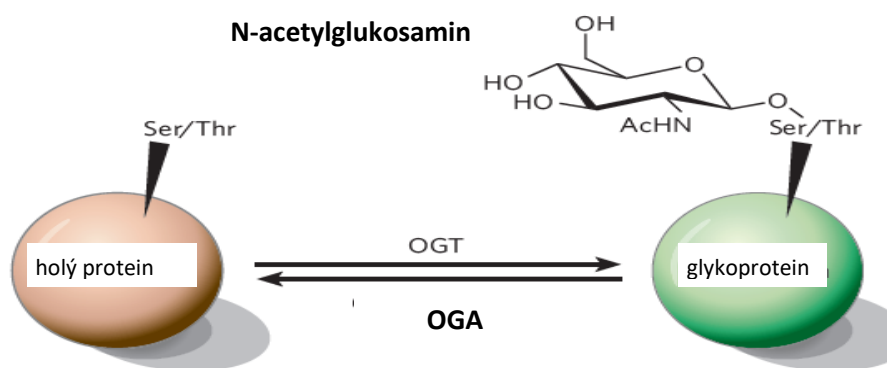
Obrázek č. 11: Chromatogramy sérového transferinu – výstupy z analýzy HPLC a CZE, převzato z [44]

Analýza vzorku pacienta s mírnou formou PMM2-CDG. a) je analýza isoform pomocí HPLC, b) pomocí CZE. U tohoto mírného typu CDG je charakteristický pouze nárůst disialotransferinu.

1.4.2.8 Regulace pomocí glykosylace

Změny glykosylačních procesů neovlivňují pouze CDG syndrom, ale i jiná daleko méně vzácná onemocnění. Změny ve struktuře O-glykanů spojených s polypeptidickým řetězcem přes N-acetylglukosamin mohou být spojeny s chronickými onemocněními, jako je neurodegenerativní Alzheimerova choroba, různá chronická onemocnění jako rakovina

a záněty, ale i diabetes mellitus 2. typu. U tohoto typu diabetu se ve většině případů projevuje výrazně zvýšený stupeň této O-glykosylace proteinů, jehož míra by mohla sloužit jako užitečný marker k diagnostice uvedených onemocnění. Příčinou zvýšení tohoto typu glykosylace je zvýšená koncentrace UDP-N-acetylglukosaminu, který je výsledkem syntézy hexosaminů. S tím je spojená narůstající exprese enzymu N-acetylglukosaminasy (OGA), která je zřejmě kompenzační odpovědí na zvýšenou syntézu tohoto typu glykoproteinu. OGA reprezentuje enzymatickou skupinu hydrolas, způsobuje enzymatický rozklad O-glykanů navázaných přes N-acetylglukosamin (O-GlcNac). Enzymem s opačnou funkcí, který katalyzuje vznik vazby, je N-acetylglukosaminyltransferasa (OGT). Jednoduché schéma funkcí těchto enzymů je ukázáno na obrázku č. 12. Regulace této syntézy resp. její degradace je dána změnami během buněčného cyklu, extracelulárními podněty, ale i stravou a stresovými situacemi. Jako standardní marker ke stanovení diabetes mellitus 2. typu slouží glykovaný hemoglobin, dále glukosový toleranční test a také sledování hladiny glukosy v plazmě. Zvýšená exprese enzymů OGA a OGT by tak mohla být užitečná jako spolehlivý marker ke stanovení této nemoci již v počáteční fázi [50,64].



Obrázek č. 12: : Jednoduché schéma funkce enzymů OGT a OGA. Převzato a upraveno podle [65]

Zkratky: OGT - N-acetylglukosaminyltransferasa, OGA - N-acetylglukosaminasa, AcHN - N-acetylamin, Ser/The – serin/ threonin, OH - hydroxylová skupina

DMII se projevuje hyperglykemií, kdy se hormon insulin není schopný navázat na insulinové receptory na povrchu svalových a tukových buněk. Tak glukosa putuje do buňky, a pokud jí tento transport není umožněn a hromadí se v krvi. Hypotéza prezentovaná v mnoha studiích je založena právě na souvislosti zvýšené O-glykosylace přes N-acetylglukosamin a inhibicí insulinu navázat se na své receptory [66].

2. Cíle předkládané bakalářské práce jsou:

1. V teoretické části popsat současné dostupné metody při studiu a diagnostice CDG.
2. V praktické části provést pilotní experiment analýzy exprese genů pro OGA a OGT v lymfocytech izolovaných z periferní krve.

3. Experimentální část

3.1 Materiál

3.1.1 Přístroje

Centrifugy:

Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen (Německo), Hettich Mikro 200 - Hettich Zentrifugen (Německo), Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific (USA), Heraeus BIOFUGE STRATOS Centrifuge - Thermo Scientific (USA), Centrifuge CM-GMT – Unimed (ČR), Centrifuga Univerzal 320R – Schoeller (Německo), Centrifuga Mikro 200 – Schoeller (Německo), Stolní centrifuga E - Centrifuge – Wealtec (USA), „Vortex“ – P-Lab (ČR)

Spektrofotometr NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific (USA)

Bioanalyzer Agilent 2100 RNA 6000 Nano Kit - Agilent Technologies (USA)

Termoblok LABNet D1200 – LABNet International (USA)

PCR destička Micro Amp Optical 96 – Well Reaction – Applied biosystems (USA)

Film na pokrytí PCR destičky Optical Adhesive Film – Applied biosystems (USA)

Pipety:

Automatické: Nichipet Ex - Nichiryo (USA), Gilson (Francie)

Digitální: Finnpiquette – Thermo electron corporation (USA)

7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem (USA)

Spektrofotometr UV-VIS Recording Spectrophotometer – Shimadzu (Japonsko)

RNA box DNA/RNA UV-cleaner UVC/IT-AR – Biosan (Litva)

PCR box PCR Box HV Mini – Holten ()

Minitřepačka Vortex 1 – IKA (Německo)

PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cyclers – Bio-Rad (USA)

3.1.2 Chemikálie

Chlorid sodný – Penta (ČR)

Chlorid draselný - Penta (ČR)

Hydrogenfosforečnan sodný heptahydrát - Penta (ČR)

Dihydrogenfosforečnan draselný - Penta (ČR)

Histopaque – Sigma (USA)

TriReagent RNA/DNA Protein Isolation Reagent – Applied Biosystems (USA)

Chloroform - Penta (ČR)

Izopropylalkohol - Penta (ČR)

ethanol - Penta (ČR)

Superdestilovaná voda Milli-Q voda - Millipore (USA)

guanidin hydrochlorid – CN Biomedicals (Německo)

ethanol - Penta (ČR)

glycerol - Penta (ČR)

ethanol - Penta (ČR)

glycerol - Penta (ČR)

SDS – Sigma (USA)

BSA – Sigma (USA)

Comaissie brilliant blue G250 – Sigma (USA)

DNasa –Turbo DNase free – Ambion (USA)

Pufr pro DNasu 10X DNase Buffer – Ambion (USA)

Inativátor DNasy DNase Inactivation reagent – Ambion (USA)

PCR voda - Top-Bio (ČR)

Primery pro reverzní transkripci Oligo dT20 primer – Promega (Velká Británie)

Deoxynukleotidy dNTP Mix – Sigma (USA)

pufr pro reverzní transkripci Fast System Buffer (FSB) - Invitrogen (USA)

DTT - Invitrogen (USA)

RNasin – Promega (Velká Británie)

Reverzní transkriptasa Super Script - Invitrogen (USA)

Primery pro qPCR Master Mix: HPRT HS02800695_M1, GAPDH HS99999905_M1, OGT HS002692228_M1, MGEA5 HS00201970_M1 - vše Thermofisher Scientific (USA)
DNA polymerasa TagMan Gene Expression Master Mix – (Applied Biosystems) (USA)

3.1.3 Biologický materiál

K analýze byly použity vzorky 7 ml periferní krve v EDTA od 2 pacientů s DMII a od 2 zdravých kontrol

Vzorek č. 1: Zdravá kontrola 1, žena ve věku 50 let

Vzorek č. 2: Pacient 1 s diabetes mellitus 2. typu, žena ve věku 17 let

Vzorek č. 3: Pacient 2 s diabetes mellitus 2. typu, muž ve věku 16 let

Vzorek č. 4: Zdravá kontrola 2, žena ve věku 30 let

Biologický materiál byl odebrán po informovaném souhlasu. Studie byla schválena etickou komisí VFN v Praze.

3.2 Metody

3.2.1 Izolace lymfocytů

Lymfocyty byly izolovány ze 7 ml krve s EDTA pomocí diferenční centrifugace na gradientu ficollu. V rámci přípravy byly všechny roztoky zahřáty na pokojovou teplotu.

Do zkumavek bylo nejdříve napipetováno 3 ml histopaque, který byl převrstven 6 ml promíchané krve. Poté byly vzorky centrifugovány se zrychlením 700 g, při teplotě 22°C po dobu 30 minut (Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen, 0 brzda). Horní část plazmy byla opatrně odstraněna a do nové zkumavky byl špičkou přenesen bílý prstenec s lymfocyty s malým množstvím histopaque. Lymfocyty byly promyty 10 ml PBS (137mM, 2,7 mM KCl, 4,3 mM Na₂HPO₄ · 12 H₂O, 1,5mM KH₂PO₄, pH=7,4) a následně centrifugovány 700 g, při teplotě 22°C po dobu 20 minut (Hettich Rotanta 460R - Hettich Zentrifugen, s brzdou 3). Supernatant byl odstraněn a pelety lymfocytů byly nejdříve rozsuspendovány v 1 ml PBS a následně promyty 10 PBS a centrifugovány za stejných podmínek. Posléze byly pelety rozsuspendovány v 0,5 ml 1x PBS, přeneseny do malé Eppendorf zkumavky a zcentrifugovány při laboratorní teplotě po dobu 3 minut, 9000g (Hettich Mikro 200 - Hettich Zentrifugen). Výsledné pelety pacientů byly rozsuspendovány v TriReagentu a skladovány při -80°C do doby použití.

3.2.2 Izolace RNA z lymfocytů

Veškeré experimenty byly prováděny v UV boxu a vzorky byly neustále ponechány na ledu při teplotě 4°C. Vzorky vyizolovaných lymfocytů byly homogenizovány pomocí 1 ml TriReagentu, které byly následně důkladně promíchány ve „vortexu“ a poté byly několikrát protáhnuty špičkou. Ke dvěma vzorkům pacientů byl TriReagent přidán ještě před zmrazením. Vzorky byly inkubovány přibližně 5 minut při laboratorní teplotě, a probíhala tak disociace nukleoproteinových komplexů. Dále byl přidán chloroform o objemu 0,2 ml, zkumavky byly po dobu přibližně 15 sekund míchány obracením a opět inkubovány po dobu 3 minuty při laboratorní teplotě. Poté byly vzorky centrifugovány na 4°C při 12 000 g 15 minut (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific, s brzdou 0). Ve zkumavce tak vznikly 3 fáze: spodní fenol-chloroformová, ve které byla rozpuštěná frakce proteinů, interfáze s DNA a horní vodná fáze s rozpuštěnou RNA. Pro precipitaci RNA byla vodná fáze přesunuta do nové zkumavky, přidáno 0,5 ml ledového izopropylalkoholu, vše bylo jemně promícháno, inkubováno při laboratorní teplotě 10 minut a centrifugováno 4°C při 12 000 g 10 minut (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific, s brzdou 9). Poté RNA vytvořila na dně zkumavky malý pelet. Při promývání byl vždy odstraněn supernatant, přidán 75% ethanol, směs byla promíchána na vortexu a centrifugována na 4°C při 10 000 g, 10 minut (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific, s brzdou 9). Poté byl opět odstraněn supernatant a vzorky centrifugovány na 4°C při 5 000 g po dobu 1 minuty (Centrifuga Mikro 200 – Schoeller). Po dokonalém odstranění supernatantu byly vzorky vysoušeny v otevřené zkumavce po dobu cca 5 minut. RNA byla dále rozpuštěna v 30 µl čerstvé Millipore vody a důkladně promíchána.

3.2.3 Měření koncentrace RNA

Poté byla změřena koncentrace RNA všech vzorků na Nanodropu při vlnové délce 260 nm (NanoDrop – 2000 Spectrophotometer – Thermo Scientific). Jelikož práce nepokračovala ten samý den, vzorky byly zmrazeny na teplotu -80°C. Změřené koncentrace jsou zaznamenány v tabulce VI (str. 48).

3.2.4 Izolace proteinové frakce z lymfocytů

Vedle izolace RNA byl použit postup, kde při izolaci RNA bylo možno vyizolovat i proteinovou frakci, která bude využita pro WB analýzy. Konkrétně: po přenosu 0,25 ml

fenol-ethanolového supernatantu do nové zkumavky následovalo smíchání s třikrát větším množstvím acetonu k objemu fenol-ethanolové fáze, tedy s 0,75 ml. Po důkladném promíchání probíhala inkubace při laboratorní teplotě 10 minut, dále centrifugace na vychlazené centrifuze na teplotu 4°C při 12 000 g po dobu 10 minut (Heraeus BIOFUGE STRATOS Centrifuge - Thermo Scientific). Při promývání proteinů byl vždy odstraněn supernatant, posléze byla peleta resuspendována v 0,5 ml promývací směsi (0,3M guanidin hydrochlorid, 95% ethanol (v/V), 2,5% glycerol (v/V)). Směs byla promíchána na „vortexu“ a opět bylo přidáno 0,5 ml promývací směsi. Následovala 10 minutová inkubace a centrifugace při 8 000 g, 5 minut, při 4°C (Heraeus BIOFUGE STRATOS Centrifuge - Thermo Scientific). Poté byl opět odstraněn supernatant a promývání bylo prováděno ještě dvakrát. Při promývání bylo důležité směs vždy důkladně promíchat, aby se odstranil zbylý fenol. Další promývání bylo provedeno, tentokrát s 1 ml směsi 75% ethanolu s 2,5% glycerolem, po kterém následovala opět 10 minutová inkubace a centrifugace za podmínek stejných jako v předchozím promývání. Dále byl důkladně odstraněn supernatant a zkumavky byly ponechány otočené na buničině po dobu cca 10 minut, aby peleta proteinů vyschla. Po promývání následovala solubilizace, kdy byly pelety s proteiny rozpouštěny v 30 μ l 1% SDS (w/V). Po důkladném promíchání byly roztoky ponechány přibližně 20 minut při laboratorní teplotě, poté byly vzorky zahřívány 3 minuty při vysoké teplotě nad 90°C a dále stáčeny na centrifuze při 10 000 g, 5 minut při laboratorní teplotě (Heraeus Multifuge X1R Centrifuge – Thermo Scientific). Supernatanty byly přeneseny do čistých zkumavek a byly připraveny pro použití na „Western blott.“

3.2.5 Měření koncentrace proteinu dle Bradfordové

U výsledného supernatantu byla změřena absorbance, ze které byla vypočítána koncentrace jednotlivých vzorků. Absorbance byla měřena v duplikátu u všech vzorků proti BSA standardu. Kalibrační přímka byla sestavena z 6 bodů (viz tabulka II, str. 45). Z každého vzorku byl odebrán 1 μ l, který byl vždy doplněn 799 μ l destilované vody. Ke každému z měřených vzorků bylo přidáno Comaissie brilliant blue G250 o objemu 200 μ l. Výsledný objem všech měřených vzorků byl 1 ml. Absorbance byly měřeny při 595 nm (Spektrofotometr UV-VIS Recording Spectrophotometer – Shimadzu). Výsledné koncentrace duplikátů byly vždy zprůměrovány a jsou zaznamenány v tabulce VII (str. 49).

Tabulka II: Příprava kalibrační přímky pro stanovení koncentrace proteinů

Kalibrační vzorek č.	Objem d H ₂ O [μl]	Objem BSA [μl]	Množství BSA [μg]
1	800	0	0
2	775	25	1
3	750	50	2
4	725	75	3
5	700	100	4
6	675	125	5

Zásobní koncentrace BSA = 2 mg/ml

3.2.6 Ošetření DNAsou

Podle naměřených koncentrací RNA u jednotlivých vzorků bylo zvoleno složení reakční směsi. Doporučuje se použít 1 μl DNAsy do koncentrace RNA 200 ng/μl, pro koncentrace v rozsahu 200-500 ng/μl se doporučuje použít 2-3 μl. Podle změřených koncentrací zaznamenaných v tabulce VI (str. 48) bylo pipetováno u kontrolních vzorků 1 μl pufru, 1 μl DNAsy a 7 μl RNA ze vzorku. Pro vzorky pacientů bylo pipetováno do nových zkumavek 1 μl pufru, 2 μl DNAsy a 6 μl RNA ze vzorku. Poté vzorky byly ponechány inkubovat při 37°C po dobu 30 minut (Termoblok LABNet D1200 – LABNet International). Dále bylo ke všem vzorkům přidáno 2 μl inaktivačního činidla DNAsy. Následovala inkubace po dobu 2 minut za občasného míchání a centrifugace na 25°C při 10 000 g, 1,5 minuty (Centrifuga Univerzal 320R – Schoeller). Poté byl supernatant s čistou RNA přenesen do nové zkumavky se snahou nekontaminovat zbytky peletky. Dále byla znovu přeměřena koncentrace RNA stejným způsobem jako v kapitole 3.2.3. Výsledné naměřené koncentrace jsou uvedeny v tabulce VIII (str. 49).

3.2.7 Reverzní transkripce

Dalším krokem byl přepis reverzní transkripcí z RNA do cDNA. Podle změřených koncentrací RNA bylo odebráno množství příslušného vzorku a ten byl doplněn vodou pro PCR na výsledný objem 8 μl. Na jednu esej tak bylo potřeba 500 ng RNA. Vzorky byly pipetovány podle tabulky III (str. 46). Dále byla připravena kontrola RT-. Poté byl napipetován mix 1, který obsahoval 5,5 μl 50 μM Oligo dT20 primeru a 5,5 μl 10 mM dNTP Mixu. Ke každému vzorku byly přidány 2 μl mixu. Výsledný objem tedy činil u všech pěti zkumavek 10 μl. Tyto směsi byly inkubovány po dobu

5 minut při teplotě 65 °C (PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler – Bio -Rad). Po uplynuté době byla směs ochlazená na teplotu přibližně 45°C a dále ponechána na ledu. Do směsi bylo dále pipetováno množství mixu 2 podle tabulky IV. SuperScript III obsahoval RNA dependentní DNA polymerasu. Po promíchání byly směsi inkubovány tentokrát při 50°C 50 minut, následovala inaktivace po dobu 15 minut při teplotě 70°C (PCR cycler DNA Engine Dyad Peltier Thermal Cycler – Bio-Rad). Reverzní transkripce byla zakončena ochlazením na 4 °C. Poté byl každý vzorek rozpipetován na dva aliquoty po 10 µl.

Tabulka III: Objemy pipetované podle naměřených koncentrací RNA

Vzorek č.	Koncentrace RNA [ng/µl]	Objem RNA [µl]	Objem PCR H ₂ O [µl]	Celkový objem [µl]
1	68,8	7,3	0,7	8
2	150,8	3,3	4,7	8
3	256,1	2,0	6,0	8
4	162,2	3,1	4,9	8

Tabulka IV: Příprava mixu 2

Složka	Zásobní koncentrace	Objemy [µl]	Kontrola RT- [µl]
Vzorky 1-4 + mix 1	-	10	
PCR H ₂ O	-	3	3
FSB	5x	4	4
DTT	0,1M	1	1
RNAasin	40U/µl	1	1
SuperScript III	200U/µl	1	1 H ₂ O
Celkový objem [µl]	-	20	20

Jelikož testovanými enzymy byly OGA a OGT, byl analyzován gen pro OGT se stejným názvem, gen pro OGA s názvem *MGEA5*, jako referenční geny byly vybrány *HPRT* a *GAPDH* geny, které byly doporučovány výrobcem TaqMan sondy.

3.2.8 qPCR

Pro qPCR bylo použito dohromady sedm vzorků, 4 analyzované vzorky, RT-kontrola z reverzní transkripce, blank a tzv. pool, který obsahoval mix čtyř původních vzorků. Příprava reakčních směsí probíhala podle tabulky V.

Tabulka V: Rozpis pro přípravu reakčních směsí qPCR

		Objemy [μl]						
Templát		Vzorek č. 1	Vzorek č. 2	Vzorek č. 3	Vzorek č. 4	RT-	blank	pool
Master mix	<i>MGEA5</i>	25						
	<i>OGT</i>							
	<i>HPRT</i>							
	<i>GAPDH</i>							
TaqMan sonda		2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5	2,5
H ₂ O		20,5	20,5	20,5	20,5	20,5	20,5	20,5
Templát		2	2	2	2	2	2 H ₂ O	2, směs templátů
Celkový objem		50	50	50	50	50	50	50

Pro jeden vzorek byl pipetován vždy jeden z primerů MasterMixu a ostatní komponenty uvedené v tabulce.

Z každého vzorku bylo pipetováno 2x25 μl do jamek na destičce pro PCR. Jamky byly pečlivě uzavřeny folií a krátce zcentrifugovány Centrifuge CM-GMT – Unimed (ČR). Dále byla destička se vzorky ponechána v přístroji pro PCR, za teplotních podmínek 50°C 2 minuty, 95°C 10 minut a za cyklických podmínek 95°C 15 sekund a 60°C 1 minutu (7 300 Real Time PCR System - Applied Biosystem), který v průběhu celého procesu zaznamenával průběh reakce. Celé PCR trvalo přibližně 100 minut a proběhlo 40 cyklů.

4. Výsledky

Ze čtyř vzorků se 7 ml krve byly izolovány lymfocyty, ke kterým bylo přidáno činidlo TriReagent, byl použit postup, při kterém je možno izolovat RNA, DNA i proteiny ze vzorku současně. Po vyizolování RNA a proteinů byla změřena absorbance, RNA se podařilo vyizolovat v koncentraci 110,2-433,3 ng/μl s čistotou od 1,86 do 1,93, po ošetření DNase pak v koncentraci 68,8-256,1 ng/μl s čistotou od 1,62 do 1,82. Koncentrace RNA u postupu s přidáním TriReagentu ihned po izolaci lymfocytů (vzorky č. 2 a 3) byly vyšší než ty, ke kterým byl TriReagent přidán až při izolaci RNA (vzorky č. 1 a 4). U vzorku č. 3 byla koncentrace nejvyšší – 256,1 ng/μl, vzorek č. 2 měl koncentraci podobnou jako vzorek č. 4, 150,8 ng/μl resp. 162,2 ng/μl. Nejnižší koncentrace byla zaznamenána u vzorku č. 1 - 68,8 ng/μl. Koncentrace proteinů byla od 2,23 do 5,51 mg/ml. Ukázalo se, že toto množství i kvalita je pro WB použitelná a dostatečná. Následovala reverzní transkripce z RNA do cDNA pro potřebu qPCR. Data z qPCR byla vyexportována pomocí automatického Thresholdu, poté z hodnot Ct duplikátů byl vypočten průměr a ten byl vyhodnocen softwarem Genex (Multid, Švédsko), do kterého byla zadána účinnost reakce 90%, kterou zaručuje výrobce TaqMan sondy. Vzhledem k malému počtu vzorků nebyla provedena kalibrační křivka, ze které by byla odečtena přesná účinnost reakce. Relativní hodnota exprese dvou sledovaných genů byla normalizována na geometrický průměr dvou referenčních genů a pro větší přehlednost byly hodnoty přepočítány na hodnotu poolu, který byl určen jako 100%. Výsledky jsou zaznamenány v tabulce IX (str. 49).

Tabulka VI: koncentrace RNA a poměry absorbancí změřených přístrojem Nanodrop

Vzorek č.	Koncentrace RNA [ng/μl]	A 260/280	A 260/230
1	110,2	1,86	1,15
2	111,4	1,90	1,44
3	433,3	1,92	0,69
4	210,9	1,93	1,66

Tabulka VII: Naměřené koncentrace proteinů

Vzorek č.	Koncentrace proteinů [mg/ml]
1	2,23
2	4,44
3	4,51
4	5,51

Tabulka VIII: Naměřené koncentrace RNA po ošetření DNasou

Vzorek č.	Koncentrace RNA [ng/μl]	A 260/280	A 260/230
1	68,8	1,72	0,97
2	150,8	1,62	0,56
3	256,1	1,82	0,64
4	162,2	1,71	0,89

Tabulka IX: Souhrnná tabulka s hodnotami Ct a relativními hodnotami exprese sledovaných genů pro všechny vzorky

Vzorek	Ct				relativní hodnota exprese	
	<i>MGEA5</i>	<i>OGT</i>	<i>HPRT</i>	<i>GAPDH</i>	<i>MGEA5</i>	<i>OGT</i>
1	28,78	27,60	32,37	27,45	149	156
2	28,94	28,21	30,43	23,72	22	17
3	27,90	26,74	30,49	23,61	42	43
4	29,46	27,93	32,89	27,74	126	163
pool	28,47	27,35	32,31	25,63	100	100

5. Diskuse

V pilotním experimentu byly naměřeny rozdílné koncentrace RNA mezi vzorky pacientů a kontrol. Velký vliv na prezentované výsledky mohl mít rozdílný přístup při práci s kontrolami a se vzorky, kdy se s izolovanými lymfocyty pacientů zacházelo jako se suspenzí, tj. k peletě lymfocytů bylo přidáno činidlo TriReagentu ihned po izolaci a poté byla suspenze zmražena, naopak pelety izolovaných lymfocytů kontrol byly zmraženy a TriReagent k nim byl přidán až při izolaci RNA. RNA je nestabilní a v peletě kontrol mohla podléhat většímu rozkladu, zatímco ve vzorcích pacientů v roztoku TriReagentu byla RNA relativně stabilní. Tento krok mohl mít bezesporu vliv na výsledek. Jeho účinek byl pozorován i během izolace RNA, kdy práce se suspenzí byla výrazně jednodušší než s čistou peletou lymfocytů (peleta se hůře rozpouštěla, disociace nukleoproteinových komplexů probíhala výrazně méně a déle). Naměřená absorbance RNA před ošetřením

DNasou byla průměrně 1,90, po ošetření DNasou pak 1,72. Čistá rozpuštěná RNA má poměr absorbancí při 260 a 280 nm v rozmezí 1,6-1,8, průměrně 1,8. Při prvním měření mohla RNA obsahovat stopy DNA, které po reakci s DNasou byly eliminovány. Tato průměrná hodnota je relativně nízká a naznačuje možnou kontaminaci fenolem z TriReagentu. U vzorku č. 2 koncentrace RNA stoupla, její čistota pak rapidně klesla, u tohoto vzorku je s jistotou možné říci, že byl kontaminován buďto fenolem nebo zbytkovými proteiny. Nižší výtěžky RNA je také možné v budoucnu navýšit intenzivnějším promícháváním špičkou při izolaci RNA.

Relativní hodnoty exprese genů pro enzymy OGA a OGT u pacientů, tedy vzorků č. 2 a 3, dosahují velmi malých hodnot, zcela opačných v porovnání se zdravými kontrolami. Podle předchozího výzkumu [47], kdy byla u izolovaných leukocytů metodou průtokové cytometrie studována exprese těchto dvou genů pro enzymy, které mají hlavní roli v syntéze resp. degradaci O-glykanů vázaných přes N-acetylglukosamin, byly očekávány zvýšené relativní hodnoty exprese těchto dvou genů u pacientů trpících diabetes mellitus typu 2 ve srovnání se zdravými jedinci. Při pohledu na tabulku IX (str. 49) je zřejmé, že získané hodnoty jsou přesně opačné. Důvodů může být několik.

První možností opačného efektu v expresi studovaných genů je rozdílný věk testovaných kontrolami a pacientů. V budoucnu je třeba se tohoto rozdílu vyvarovat.

Další možností mohou být nepříliš vhodně zvolené referenční geny. Hodnota Ct značí tzv. prahovou hodnotu cyklu, množství fluorescence dosáhne hodnoty nad práh pozadí a od té doby roste lineárně až do vyčerpání některého z komponentů reakce, čímž je PCR ukončeno. Jejich hodnoty Ct by měly být pro všechny vzorky stejné, ve skutečnosti však pro každý vzorek byly velmi rozdílné. Dosahovaly hodnot od 30. cyklu po 33. cyklus pro *HPRT* a pro *GAPDH* od 23. po 28. cyklus. Hodnoty Ct genu *HPRT* jsou obecně relativně vysoké, měly by dosahovat maximálně 35. cyklu, ideálně do 30. cyklu, poté už výsledky nejsou průkazné a v dalším pokusu by se mělo pracovat s vyšším množstvím templátu. Je zřejmé, že relativní exprese sledovaných genů přepočtená na oba referenční geny, je jejich nepřesnými hodnotami velmi ovlivněna. Pro příští experiment, který by měl být proveden s větším množstvím vzorků, je možné použít jako referenční geny např. geny pro β -aktin a *TBP* geny.

Samotný proces qPCR probíhal správně, bylo odebráno veškeré množství inaktivátoru. Tím bylo mléko, které vyvazovalo divalentní ionty, které jsou potřeba pro enzymatické štěpení nukleových kyselin i syntézu v pozdějších krocích. Zároveň působí

jako inhibitor pro následné reakce. Vzorky obsahující blank bez templátu a RT- bez polymerasy byly připraveny správně, podle PCR grafu v nich neprobíhala žádná polymerační reakce, koncentrace fluorescenčního činidla byla po celou dobu konstantní. Všechny vzorky z duplikátů vykazovaly velmi podobné křivky a rozdíly Ct jednoho duplikátu byly minimální. Teoretické celkové výtěžky z celkového množství 7 ml periferní krve u vzorku č. 1 3,3 µg RNA a 267 µg proteinů, u vzorku č. 2 3,3 µg RNA a 532 µg proteinů, u vzorku č. 3 13,0 µg RNA a 541 µg proteinů, u vzorku č. 4 6,3 µg RNA a 661 µg proteinů. Tyto výtěžky se v pilotním experimentu ukázaly jako dostačující pro analýzu metodou Western blott i pro budoucí analýzu pacientů s obezitou či s diabetem mellitus 2. typu pomocí qPCR.

6. Souhrn

Byly popsány v současnosti dostupné „screeningové“ i výzkumné metody pro analýzu glykanů v případě podezření na dědičné poruchy glykosylace, včetně isoelektrické fokusace, HPLC a zónové kapilární elektroforézy, hmotnostní spektroskopie, měření enzymové aktivity, analýzy PDO a LLO a molekulární diagnostiky.

Byla zmíněna úloha glykosylace v regulaci i reakci na chronické i akutní procesy v buňce.

V experimentální části byla provedena pilotní studie zaměřená na expresi klíčových enzymů v regulaci glykosylace pomocí O-GlcNAc, která zahrnovala izolaci lymfocytů z periferní krve od pacientů s DMII a kontrol, následnou izolaci RNA pro qPCR a izolaci proteinové frakce pro WB, provedení qPCR u genů pro OGA a OGT a dvou referenčních genů *HPRT* a *GAPDH*.

Uvedený postup bude sloužit jako podklad pro další analýzu exprese genů pro OGA a OGT v širším souboru pacientů s obezitou a DMII.

7. Literární zdroje

- [1] A. Varki, N. Sharon, Historical Background and Overview, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [2] T. Marquardt, J. Denecke, Congenital disorders of glycosylation: review of their molecular bases, clinical presentations and specific therapies, *Eur. J. Pediatr.*, 162 (2003) 359–379.
- [3] Y. Wada, Mass spectrometry for congenital disorders of glycosylation, CDG, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 838 (2006) 3–8.
- [4] H. Freeze, E.A. Eklund, B. Ng, M.C. Patterson, Neurology of inherited glycosylation disorders, *Lancet Neurol.*, 11 (2012) 453–466.
- [5] I. Brockhausen, H. Schachter, P. Stanley, O-GalNAc Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [6] H.H. Freeze, R.S. Haltiwanger, Other Classes of ER/Golgi-derived Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [7] H. Lis, N. Sharon, Protein glycosylation, *Eur. J. Biochem.*, 218 (1993) 1–27.
- [8] A. Varki, J.B. Lowe, Biological Roles of Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [9] D.J. Lefeber, Protein-Specific Glycoprofiling for Patient Diagnostics, *Clin. Chem.*, 62 (2016) 9–11.

- [10] R. Núñez Miguel, J. Sanders, J. Furmaniak, B. Rees Smith, Glycosylation pattern analysis of glycoprotein hormones and their receptors, *J. Mol. Endocrinol.*, 58 (2017) 25–41.
- [11] P. Stanley, H. Schachter, N. Taniguchi, N-Glycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [12] H.H. Freeze, H. Schachter, Genetic Disorders of Glycosylation, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [13] J.D. Esko, K. Kimata, U. Lindahl, Proteoglycans and Sulfated Glycosaminoglycans, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [14] M.A. Ferguson, T. Kinoshita, G.W. Hart, Glycosylphosphatidylinositol Anchors, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [15] R.L. Schnaar, A. Suzuki, P. Stanley, Glycosphingolipids, in: A. Varki, R.D. Cummings, J.D. Esko, H.H. Freeze, P. Stanley, C.R. Bertozzi, G.W. Hart, M.E. Etzler (Eds.), *Essent. Glycobiol.*, 2nd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor (NY), 2009.
- [16] H.H. Freeze, Genetic defects in the human glycome, *Nat. Rev. Genet.*, 7 (2006) 537–551.
- [17] T. Hennet, Diseases of glycosylation beyond classical congenital disorders of glycosylation, *Biochim. Biophys. Acta*, 1820 (2012) 1306–1317.

- [18] J. Jaeken, T. Hennot, G. Matthijs, H.H. Freeze, CDG nomenclature: time for a change!, *Biochim. Biophys. Acta*, 1792 (2009) 825–826.
- [19] S.S. Goreta, S. Dabelic, J. Dumić, Insights into complexity of congenital disorders of glycosylation, *Biochem. Medica*, 22 (2012) 156–170.
- [20] H.H. Freeze, J.X. Chong, M.J. Bamshad, B.G. Ng, Solving Glycosylation Disorders: Fundamental Approaches Reveal Complicated Pathways, *Am. J. Hum. Genet.*, 94 (2014) 161–175.
- [21] J. Jaeken, Congenital disorders of glycosylation (CDG): it's (nearly) all in it!, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34 (2011) 853–858.
- [22] H. Hansíková, N. Ondrušková, T. Honzík, K. Veselá, E. Horová, Š. Švecová, M. Tesařová, J. Zeman, Activity of phosphomannomutase 2 in patients with suspected congenital disorder of glycosylation. *Klinická Biochemie a Metabolismus*, 24 2016 67-74
- [23] T. Arndt, Carbohydrate-deficient Transferrin as a Marker of Chronic Alcohol Abuse: A Critical Review of Preanalysis, Analysis, and Interpretation, *Clin. Chem.*, 47 (2001) 13–27.
- [24] E. Marklová, Z. Albahri, Screening and diagnosis of congenital disorders of glycosylation, *Clin. Chim. Acta*, 385 (2007) 6–20.
- [25] P. Bengtson, B.G. Ng, J. Jaeken, G. Matthijs, H.H. Freeze, E.A. Eklund, Serum transferrin carrying the xeno-tetrasaccharide NeuAc-Gal-GlcNAc₂ is a biomarker of ALG1-CDG, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 39 (2016) 107–114.
- [26] M. Van Scherpenzeel, E. Willems, D.J. Lefeber, Clinical diagnostics and therapy monitoring in the congenital disorders of glycosylation, *Glycoconj. J.*, 33 (2016) 345–358.
- [27] S. Wopereis, S. Grünewald, K.M.L.C. Huijben, É. Morava, R. Mollicone, B.G.M. van Engelen, D.J. Lefeber, R.A. Wevers, Transferrin and Apolipoprotein C-III Isofocusing Are Complementary in the Diagnosis of N- and O-Glycan Biosynthesis Defects, *Clin. Chem.*, 53 (2007) 180–187.

- [28] N. Gordon, Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes, *Postgrad. Med. J.*, 76 (2000) 145.
- [29] M. Jackson, P. Clayton, S. Grunewald, G. Keir, K. Mills, P. Mills, B. Winchester, V. Worthington, E. Young, Elevation of plasma aspartylglucosaminidase is a useful marker for the congenital disorders of glycosylation type I (CDG I), *J. Inherit. Metab. Dis.*, 28 (2005) 1197–1198.
- [30] H. Schachter, J. Jaeken, Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome type II, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Mol. Basis Dis.*, 1455 (1999) 179–192.
- [31] H. Hansíková, N. Ondrušková, K. Veselá, A. Vondráčková, Z. Hájková, E. Horová, M. Tesařová, T. Honzík, J. Zeman, Laboratorní přístup k diagnostice dědičných poruch glykosylace, 28. Pracovní dny, Dědičné metabolické poruchy 15. – 17. května 2013, Tábor, Hotel Dvořák
- [32] F. de Loos, K.M.L.C. Huijben, N.C.A.J. van der Kar, L.A.H. Monnens, L.P.W.J. van den Heuvel, J.E.M. Groener, R.A. de Moor, R.A. Wevers, Hemolytic uremic syndrome attributable to *Streptococcus pneumoniae* infection: a novel cause for secondary protein N-glycan abnormalities, *Clin. Chem.*, 48 (2002) 781–784.
- [33] S. Wopereis, S. Grunewald, É. Morava, J.M. Penzien, P. Briones, M.T. García-Silva, P.N.M. Demacker, K.M.L.C. Huijben, R.A. Wevers, Apolipoprotein C-III Isofocusing in the Diagnosis of Genetic Defects in O-Glycan Biosynthesis, *Clin. Chem.*, 49 (2003) 1839–1845.
- [34] P. Clayton, B. Winchester, E. Di Tomaso, E. Young, G. Keir, C. Rodeck, Carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome: normal glycosylation in the fetus, *Lancet Lond. Engl.*, 341 (1993) 956.
- [35] G. Matthijs, E. Schollen, E. Van Schaftingen, The prenatal diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG), *Prenat. Diagn.*, 24 (2004) 114–116.
- [36] G. de Jong, J.P. van Dijk, H.G. van Eijk, The biology of transferrin, *Clin. Chim. Acta Int. J. Clin. Chem.*, 190 (1990) 1–46.

- [37] G. Keir, B.G. Winchester, P. Clayton, Carbohydrate-deficient glycoprotein syndromes: inborn errors of protein glycosylation, *Ann. Clin. Biochem.*, 36 (Pt 1) (1999) 20–36.
- [38] F. Foulquier, E. Vasile, E. Schollen, N. Callewaert, T. Raemaekers, D. Quelhas, J. Jaeken, P. Mills, B. Winchester, M. Krieger, W. Annaert, G. Matthijs, Conserved oligomeric Golgi complex subunit 1 deficiency reveals a previously uncharacterized congenital disorder of glycosylation type II, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 103 (2006) 3764.
- [39] S. Grünewald, G. Matthijs, J. Jaeken, Congenital Disorders of Glycosylation: A Review, *Pediatr. Res.*, 52 (2002) 618–624.
- [40] P. de Lonlay, M. Cuer, S. Vuillaumier-Barrot, G. Beaune, P. Castelnau, M. Kretz, G. Durand, J.M. Saudubray, N. Seta, Hyperinsulinemic hypoglycemia as a presenting sign in phosphomannose isomerase deficiency: A new manifestation of carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome treatable with mannose, *J. Pediatr.*, 135 (1999) 379–383.
- [41] N. Ondrušková, Studium transferinu jako markeru dědičných poruch glykosylace, Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy, katedra biochemie, Praha 2010, 32-34
- [42] M. Guillard, Y. Wada, H. Hansikova, I. Yuasa, K. Vesela, N. Ondruskova, M. Kadoya, A. Janssen, L.P.W.J.V. den Heuvel, E. Morava, J. Zeman, R.A. Wevers, D.J. Lefeber, Transferrin mutations at the glycosylation site complicate diagnosis of congenital disorders of glycosylation type I, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34 (2011) 901–906.
- [43] E. Marklová, Z. Albahri, Transferrin D protein variants in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation (CDG), *J. Clin. Lab. Anal.*, 23 (2009) 77–81.
- [44] E. Quintana, R. Montero, M. Casado, A. Navarro-Sastre, M.A. Vilaseca, P. Briones, R. Artuch, Comparison between high performance liquid chromatography and capillary zone electrophoresis for the diagnosis of congenital disorders of

- glycosylation, *J. Chromatogr. B Analyt. Technol. Biomed. Life. Sci.*, 877 (2009) 2513–2518.
- [45] H.A. Carchon, R. Chevigné, J.-B. Falmagne, J. Jaeken, Diagnosis of congenital disorders of glycosylation by capillary zone electrophoresis of serum transferrin, *Clin. Chem.*, 50 (2004) 101–111.
- [46] A. Helander, G. Eriksson, H. Stibler, J.O. Jeppsson, Interference of transferrin isoform types with carbohydrate-deficient transferrin quantification in the identification of alcohol abuse, *Clin. Chem.*, 47 (2001) 1225–1233.
- [47] TF - Serotransferrin precursor - Homo sapiens (Human) - TF gene & protein, <http://www.uniprot.org/uniprot/P02787>, 12. 5. 2017
- [48] N. Ondrušková, T. Honzík, J. Kytnarová, M. Matoulek, J. Zeman, H. Hansíková, Isoelectric Focusing of Serum Apolipoprotein C-III as a Sensitive Screening Method for the Detection of O-glycosylation Disturbances, *Prague Med. Rep.*, 116 (2015) 73–86.
- [49] H.R. Bergen, J.M. Lacey, J.F. O'Brien, S. Naylor, Online Single-Step Analysis of Blood Proteins: The Transferrin Story, *Anal. Biochem.*, 296 (2001) 122–129.
- [50] C. Springhorn, T.E. Matsha, R.T. Erasmus, M.F. Essop, Exploring leukocyte O-GlcNAcylation as a novel diagnostic tool for the earlier detection of type 2 diabetes mellitus, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 97 (2012) 4640–4649.
- [51] M. Kubista, J.M. Andrade, M. Bengtsson, A. Forootan, J. Jonák, K. Lind, R. Sindelka, R. Sjöback, B. Sjögren, L. Strömbom, A. Ståhlberg, N. Zoric, The real-time polymerase chain reaction, *Mol. Aspects Med.*, 27 (2006) 95–125.
- [52] Real-time PCR | LabGuide.cz – Průvodce laboratoří, <http://www.labguide.cz/metody/real-time-pcr>, 12. 5. 2017
- [53] K. Mills, P. Mills, M. Jackson, V. Worthington, C. Beesley, A. Mann, P. Clayton, S. Grunewald, G. Keir, L. Young, J. Langridge, N. Mian, B. Winchester, Diagnosis of congenital disorders of glycosylation type-I using protein chip technology, *PROTEOMICS*, 6 (2006) 2295–2304.

- [54] J.M. Lacey, H.R. Bergen, M.J. Magera, S. Naylor, J.F. O'Brien, Rapid determination of transferrin isoforms by immunoaffinity liquid chromatography and electrospray mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 47 (2001) 513–518.
- [55] L. Sturiale, R. Barone, D. Garozzo, The impact of mass spectrometry in the diagnosis of congenital disorders of glycosylation, *J. Inherit. Metab. Dis.*, 34 (2011) 891–899.
- [56] On the Mechanism of Electrospray Ionization Mass Spectrometry (ESIMS) - Electrospray and MALDI Mass Spectrometry: Fundamentals, Instrumentation, Practicalities, and Biological Applications, Second Edition - Kebarle - Wiley Online Library, 1-47
- [57] Y. Wada, Mass spectrometry of transferrin and apolipoprotein C-III for diagnosis and screening of congenital disorder of glycosylation, *Glycoconj. J.*, 33 (2016) 297–307.
- [58] R. Knochenmuss, MALDI Ionization Mechanisms: An Overview, in: R.B. Cole (Ed.), *Electrospray MALDI Mass Spectrom.*, John Wiley & Sons, Inc., 2010: 147–183.
- [59] N. Callewaert, E. Schollen, A. Vanhecke, J. Jaeken, G. Matthijs, R. Contreras, Increased fucosylation and reduced branching of serum glycoprotein N-glycans in all known subtypes of congenital disorder of glycosylation I, *Glycobiology*, 13 (2003) 367–375.
- [60] K. Panneerselvam, H.H. Freeze, Mannose corrects altered N-glycosylation in carbohydrate-deficient glycoprotein syndrome fibroblasts, *J. Clin. Invest.*, 97 (1996) 1478–1487.
- [61] S. Wopereis, D.J. Lefeber, É. Morava, R.A. Wevers, Mechanisms in Protein O-Glycan Biosynthesis and Clinical and Molecular Aspects of Protein O-Glycan Biosynthesis Defects: A Review, *Clin. Chem.*, 52 (2006) 574–600.
- [62] P. Mills, K. Mills, P. Clayton, A. Johnson, D. Whitehouse, B. Winchester, Congenital disorders of glycosylation type I leads to altered processing of N-linked glycans, as well as underglycosylation, *Biochem. J.*, 359 (2001) 249–254.
- [63] A. Helander, A. Husa, J.-O. Jeppsson, Improved HPLC method for carbohydrate-deficient transferrin in serum, *Clin. Chem.*, 49 (2003) 1881–1890.

- [64] M.R. Bond, J.A. Hanover, O-GlcNAc cycling: a link between metabolism and chronic disease, *Annu. Rev. Nutr.*, 33 (2013) 205–229.
- [65] G.W. Hart, M.P. Housley, C. Slawson, Cycling of O-linked beta-N-acetylglucosamine on nucleocytoplasmic proteins, *Nature*, 446 (2007) 1017–1022.
- [66] S.A. Whelan, W.B. Dias, L. Thiruneelakantapillai, M.D. Lane, G.W. Hart, Regulation of insulin receptor substrate 1 (IRS-1)/AKT kinase-mediated insulin signaling by O-Linked beta-N-acetylglucosamine in 3T3-L1 adipocytes, *J. Biol. Chem.*, 285 (2010) 5204–5211.

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

Jméno a příjmení s adresou	Číslo OP	Datum vypůjčení	Poznámka